

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intellectual  
Oficina internacional(43) Fecha de publicación internacional  
23 de Octubre de 2003 (23.10.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 03/086450 A1(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: A61K 38/18,  
38/17, 48/00, C07K 14/475, 14/71, C12N 15/12, A61P  
43/00

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU03/00004

(22) Fecha de presentación internacional:  
11 de Abril de 2003 (11.04.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
CU2002/0076 15 de Abril de 2002 (15.04.2002) CU(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTEC-  
NOLOGIA [CU/CU]; Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán,  
Playa, 10600 Ciudad de la Habana (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): BEQUET  
ROMERO, Mónica [CU/CU]; Calle Zapata # 1868  
apto18 e/12, y 14, Plaza de La Revolución., CP10400  
Ciudad de la Habana (CU). ACEVEDO CASTRO, Boris,  
Ernesto [CU/CU]; Calle Segunda # 565 e/, Ayestarán y  
Ayuntamiento, Plaza de la Revolución., 12000 Ciudad  
de la Habana (CU). GAVILONDO COWLEY, Jorge,  
Víctor [CU/CU]; Calle G # 460 apto11 e/19 y 21, Plaza  
de La Revolución., 10400 Ciudad de la Habana (CU).  
FERNÁNDEZ MOLINA, Luis, Enrique [CU/CU];  
Calle 180 entre 1ra. A y 5ta. A, Edif. A3, Apto. 13,  
Rpto. Flores, Playa., 10200 Ciudad de la Habana (CU).  
LÓPEZ OCEJO, Omar [CU/CU]; Calle 186 No. 3115  
Apto. 11 A, e/ 31 y 33, Playa, 10600 Ciudad de la  
Habana (CU). SILVA RODRÍGUEZ, Ricardo, de la  
Caridad [CU/CU]; Calle 15 #4209 e/42 y 44, Playa.,11300 Ciudad de la Habana (CU). MUSACHIO LASA,  
Alexis [CU/CU]; Calle 128 # 7117 e/71 y 73, La Habana.,  
32100 Mariel (CU). GALBAN RODRÍGUEZ, Ernesto  
[CU/CU]; Calle 3ra # 23604 e/236 y 238, Playa, 12200  
Ciudad de la Habana (CU). VÁZQUEZ BLOMQUIST,  
Dania, Marcia [CU/CU]; Calle 49 # 2805 e/28 y 49A,  
Playa., 11300 Ciudad de La Habana (CU).(74) Mandatario: POVEDA MARCHECO, Argia; Ave. 31  
e/ 158 Y 190, Cubanacán, Playa., 10600 Ciudad de la Ha-  
bana (CU).(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,  
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente  
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,  
SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-  
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-  
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: ACTIVE ANTIANGIOGENIC THERAPY

(54) Título: INMUNOTERAPIA ACTIVA ANTIANGIOGENICA.

(57) Abstract: The invention relates to the application of oligonucleotide and polypeptide sequences of molecules belonging to the vascular permeability factor (VPF) family, their receptors and co-receptors and to their modifications in active immunotherapy against pathological entities whose course is associated with an increase in vasculature. Said procedures can be used, inter alia, in monotherapy or combined therapy for the treatment of cancer and its metastasis, acute and chronic inflammatory processes, infectious diseases, autoimmune diseases, diabetic and infant retinopathy, rejection of transplanted organs, macular degeneration, neovascular glaucoma, hemangioma and angiofibroma.

(57) Resumen: Aplicación de secuencias oligonucleotídicas y polipeptídicas de moléculas pertenecientes a la familia del factor de permeabilidad vascular (VPF), sus receptores y correceptores; así como modificaciones de los mismos, en la inmunoterapia activa de entidades patológicas cuyo curso se asocia al aumento de la vasculatura. Estos procedimientos pueden ser empleados en la terapia única o combinada para el tratamiento del cáncer y sus metástasis, los procesos inflamatorios agudos y crónicos, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, la retinopatía diabética y del recién nacido, el rechazo al trasplante de órganos, la degeneración macular, los glaucomas neovasculares, hemangiomas y los angiofibromas, entre otros.



WO 03/086450 A1

## INMUNOTERAPIA ACTIVA ANTIANGIOGÉNICA

La presente invención esta relacionada con el campo de la biotecnología y la industria farmacéutica, en particular con la inmunización activa empleando como blanco moléculas relacionadas con la angiogénesis.

El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de aquellos pre-existentes se denomina angiogénesis. Este evento se encuentra ampliamente regulado por un equilibrio de factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Entre las enfermedades cuyo curso se ha relacionado con la inducción de factores pro-angiogénicos y la formación de nuevos vasos sanguíneos de forma anómala están: (a) el cáncer (tanto los tumores primarios como sus metástasis), (b) procesos inflamatorios agudos y crónicos como el asma, el distrés respiratorio, la endometriosis, la aterosclerosis, y los edemas tisulares, (c) enfermedades de origen infeccioso como las Hepatitis y el sarcoma de Kaposi, (d) enfermedades autoinmunes como la diabetes, la soriasis, la artritis reumatoide, la tiroiditis, y (e) otras varias enfermedades y estados tales como la retinopatía diabética y del recién nacido, el rechazo al transplante de órganos, la degeneración macular, los glaucomas neovasculares, los hemangiomas y los angiofibromas (Carmeliet P y Jain RK. Nature 407:249, 2000; Kuwano M, et al. Intern Med 40:565, 2001). Un procedimiento terapéutico potencialmente atractivo para muchos de estos casos pudiera basarse en la inhibición de la actividad de los factores proangiogénicos que estimulan la formación anómala de vasos, mediante su neutralización o la de sus receptores, o la eliminación de la fuente productora de los mismos.

Los factores de crecimiento del endotelio vascular son una familia de moléculas que inducen de manera directa y específica la formación de nuevos vasos (Leung Science 246:1306, 1989; Klagsburn M, Annual Rev Physiol 33:217, 1991). Esta familia comprende al factor de permeabilidad vascular, también conocido como factor de crecimiento del endotelio vascular VPF/VEGF (ahora denominado VEGF-A), el factor de crecimiento de placenta PlGF, los factores de crecimiento derivados de plaquetas PDGF-A y PDGF-B, y otras cuatro nuevas moléculas relacionadas estructural y funcionalmente con el VEGF-A, que se han denominado VEGF-B/VRF, VEGF-C/VRP, VEGF-D/FIGF, y VEGF-E (Olofsson B et al. PNAS USA 93:2576, 1996; Joukov V et al. EMBO J 15:290, 1996; Yamada Y et al. Genomics 42:483, 1997; Ogawa S et al. J Biol Chem 273:31273, 1998).

El VEGF-A es una glicoproteína homodimérica formada por dos subunidades de 23 kDa (Ferrara N, et al. Biochem Biophys Res Commun 165:198, 1989) de la cual

existen 5 isoformas monoméricas derivadas del corte y empalme diferencial de un mismo ARN. Estas incluyen 2 isoformas que se mantienen unidas a la membrana celular (VEGF 189 y VEGF 206) y 3 de naturaleza soluble (VEGF 121, VEGF 145, y VEGF 165). La isoforma VEGF 165 es la más abundante en tejidos de mamíferos, excepto en pulmón y corazón, donde predomina el VEGF 189 (Neufeld G et al. *Canc Met Rev* 15:153, 1995), y en placenta, donde prevalece la expresión del VEGF 121. (Shibuya MA et al. *Adv Canc Res* 67:281, 1995).

El VEGF-A es la proteína más estudiada y caracterizada de esta familia, por lo que su alteración se ha descrito en un número mayor de enfermedades. Su sobre-expresión se asocia con tumores de diferente origen y localización y sus metástasis (Grunstein J et al. *Cancer Res* 59:1592, 1999), procesos inflamatorios crónicos como la colitis ulcerativa y enfermedad de Chron (Kanazawa S, et al. *Am J Gastroenterol* 96:822, 2001), psoriasis (Detmar M, et al. *J Exp Med* 180:1141, 1994), distrés respiratorio (Thickett DR et al. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1601, 2001), aterosclerosis (Celletti FL et al. *Nat Med* 7:425, 2001; Couffinhal T et al. *Am J Pathol* 150:1653, 1997), endometriosis (McLaren J. *Hum Reprod Update* 6:45, 2000), asma (Hoshino M, et al. *J Allergy Clin Immunol* 107:295, 2001), artritis reumatoide y osteoartritis (Pufe T et al. *J Rheumatol* 28:1482, 2001), tiroiditis (Nagura S et al. *Hum Pathol* 32:10, 2001), retinopatía diabética y del recién nacido (Murata T et al. *Lab Invest* 74:819, 1996; Reynolds JD. *Paediatr Drugs* 3:263, 2001), degeneración macular y glaucomas (Wells JA et al. *Br J Ophthalmol* 80:363, 1996; Tripathi RC et al. *Ophthalmology* 105:232, 1998), edemas tisulares (Kaner RJ et al. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22:640 2000; Ferrara N *Endocrinol Rev* 13:18, 1992), obesidad (Tonello C et al. *FEBS Lett* 442:167, 1999), hemangiomas (Wizigmann S y Plate KH *Histol Histopathol* 11:1049, 1996), en el líquido sinovial de pacientes con artropatías inflamatorias (Bottomley MJ et al. *Clin Exp Immunol* 119:182, 2000) y asociado al rechazo al trasplante (Vasir B, et al. *Transplantation* 71:924, 2001). En el caso particular de los tumores, las células que expresan las tres isoformas básicas del VEGF-A: 121, 165 y 189, son las que crecen con mayor rapidez *in vivo*; mientras que en sus estadios finales los tumores limitan la expresión a la isoforma 165 o, en ausencia de esta, a una combinación de 121 con 189, que lejos de ser aditiva, evidencia una cooperación que fortalece la red vascular tumoral (Grunstein J. *Mol Cell Biol* 20:7282, 2000).

En 1991 se describió el PIGF, que no es capaz de inducir la proliferación endotelial en su forma homodimérica (Maglione D et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9267, 1991, DiSalvo J et al. *J Biol Chem* 270:7717, 1995). Con la sobre-regulación del PIGF y con ello de la señal que se trasmite vía VEGFR1, las células endoteliales

- amplifican su respuesta al VEGF durante el cambio al fenotipo angiogénico que se asocia a ciertas patologías (Carmeliet P et al. Nat Med 7:575, 2001) la expresión del PlGF se ha relacionado con la vascularización en meningiomas y gliomas humanos (Nomura M et al. J Neurooncol 40:123,1998). Esta molécula forma heterodímeros con el VEGF165 con actividad proangiogénica, cuya sobre-expresión se ha descrito en el medio condicionado por diversas líneas celulares de origen tumoral (Cao Y et al. J Biol Chem 271:3154,1996), y asociado a la evolución de la artritis reumatoide y las artropatías inflamatorias primarias en general (Bottomley MJ et al. Clin Exp Immunol 119:182, 2000)
- La sobre-expresión del resto de los miembros de la familia del VEGF, menos estudiados, se asocia también a diversas patologías. El VEGF-B se ha relacionado con los tumores de mama, ovario, riñón, melanoma, y los fibrosarcomas (Sowter HM, et al. Lab. Invest. 77:607,1997; Salven P Am. J. Pathol. 153:103, 1998, Gunningham SP et al. Cancer Res 61:3206, 2001), y la expresión diferenciada *in vitro* de la isoforma VEGF-B 167 se ha reportado en células tumorales de diferentes orígenes (Li X, et al. Growth Factors 19:49, 2001). Los VEGF-C y VEGF-D se implican en la regulación de la formación de vasos linfáticos (Joukov V et al. EMBO J 15:290,1996) y la sobre-expresión del VEGF-C se ha asociado a edemas tisulares, tumores de mama, pulmón, cabeza y cuello, esófago, estómago, linfomas, próstata, y nódulos metastásicos (Kajita T, et al. Br J Cancer 85:255, 2001; Kitadi Y, et al Int J Cancer 93:662, 2001; Hashimoto I, et al. Br J Cancer 85:93, 2001; Kinoshita J, et al. Breast Cancer Res Treat 66:159, 2001; Ueda M, et al. Gynecol Oncol 82:162, 2001; Salven P Am. J. Pathol. 153:103, 1998; O-Charoenrat P et al. Cancer 92:556, 2001). En el caso del VEGF-D, su sobre-expresión por células tumorales se ha relacionado a un aumento *in vivo* de la vasculatura linfática tumoral y al incremento de las metástasis en nódulos linfáticos (Stacker SA, et al. Nat Med 7:186, 2001; Marconcini L et al. Proc Natl Acad Sci U S A 96:9671, 1999).
- Las alteraciones de la función de las células endoteliales inducidas por las moléculas de la familia del VEGF están mediadas por la unión de estas a receptores celulares tirosina quinasa clase III, que hasta ahora incluyen al VEGFR1 (Flt1), al VEGFR2 (KDR/Flk1) y al VEGFR3 (Flt4) (Kaipainen A J. Exp. Med. 178:2077, 1993). Se ha identificado el dominio 2 N-terminal como el responsable de la unión a los ligandos, propiciándose la fosforilación del dominio citoplasmático y la transducción de la señal (Davis-Smyth T et al EMBO 15:4919, 1996).
- Los ligandos identificados para el VEGFR1 incluyen el VEGF-A, el PlGF, y el VEGF-B, en orden decreciente de afinidad (Shibuya M Int J BiochemCell Biol 33: 409, 2001). En células endoteliales este receptor "secuestra" el VEGF circulante (Gille H

et al *EMBO J.* 19:4064, 2000). La unión del VEGF-A al VEGFR1 expresado en el linaje hematopoyético influye de manera significativa sobre la activación del factor transcripcional NF $\kappa$ B en los precursores de células dendríticas, y en linfocitos B y T. Esta última interacción es relevante en el establecimiento *in vivo* de un balance inmunológico desfavorable donde disminuye la maduración de células dendríticas y la fracción de linfocitos T, fenómeno observado en pacientes inmunosuprimidos, y en particular con cáncer (Dikov MM et al *Canc Res* 61:2015, 2001; Gabrilovich D et al. *Blood* 92:4150, 1998). La sobre-expresión de este receptor se ha relacionado con la soriasis, el cáncer de endometrio, y el carcinoma hepatocelular (Detmar M, et al. *J Exp Med* 180:1141, 1994; Yokoyama Y et al *Gynecol Oncol* 77:413, 2000; Ng IO Am *J Clin Patol* 116:838, 2001).

El receptor VEGFR2 (KDR/Fik1) media los efectos biológicos del VEGF-A, y también se une a los ligandos VEGF-C y VEGF-D. Este receptor se expresa de manera diferencial en el endotelio activo y en algunas líneas celulares de origen tumoral donde establece lazos autocrinos con el VEGF secretado. Además de estar involucrado en las patologías ya descritas que se relacionan con la sobre-expresión de sus ligandos, su sobre-expresión en particular se ha relacionado con el avance: del cáncer de endometrio (Giatromanolaki A et al, *Cancer* 92:2569, 2001), de mesoteliomas malignos (Strizzi L et al. *J Pathol* 193:468, 2001), de neoplasmas astrocíticos (Carroll RS et al. *Cancer* 86:1335, 1999), de cáncer primario de mama (Kranz A et al. *Int J Cancer* 84:293, 1999), de cáncer gástrico tipo intestinal (Takahashi Y et al *Clin Cancer Res* 2:1679, 1996), de glioblastoma multiforme, oligodendrogliomas anaplasticos, y ependimomas con necrosis (Chan AS et al. *Am J Surg Pathol* 22:816, 1998). La sobre-expresión del KDR se ha asociado, además, a la enfermedad autonómica VHL y a hemangioblastomas (Wizigmann-Voos S et al *Cancer Res* 55:1358, 1995), al avance de la retinopatía diabética (Ishibashi T. *Jpn J Ophthalmol* 44:323. 2000) y, junto al Flt-1, a las reacciones de hipersensibilidad retardada (Brown LF et al *J Immunol* 154:2801, 1995)

La linfangiogénesis mediada por VEGFC y VEGFD tiene lugar a partir de la unión de estos a su receptor FLT4 o VEGFR3 que se expresa en el endotelio linfático. En algunos casos aún cuando no hay sobre-expresión de los ligandos el aumento de la expresión del receptor se ha relacionado con un pronóstico adverso en el desarrollo de un grupo de entidades patológicas, a resaltar: la retinopatía diabética (Smith G. Br *J Ophthalmol* 1999 Apr;83(4):486-94), la inflamación crónica y las úlceras (Paavonen K et al, *Am J Pathol* 156:1499, 2000), el establecimiento de metástasis en nódulos linfáticos y evolución del cáncer de mama (Gunningham SP. *Clin Cancer Res* 6:4278, 2000 Valtola R et al. *Am J Pathol* 154:1381, 1999), asociado a tumores

- nasofaríngeos y a carcinomas escamosos orales (Saaristo A et al. *Am J Pathol* 157:7, 2000; Moriyama M et al. *Oral Oncol* 33:369, 1997). Además, la sobre-expresión del VEGFR3 es un marcador sensible del sarcoma de Kaposi, los hemangioendoteliomas tipo Dabska y de la linfangiomatosis cutánea (Folpe AL et al. *Mod Pathol* 13:180, 2000; Lymboussaki A et al. *Am J Pathol* 153:395, 1998).
- Recientemente se identificaron dos receptores con capacidad de unión a VEGF denominados NRP1 y NRP2 que pertenecen a la familia de las neuropilinas (NRP), y que actúan como co-receptores para isoformas específicas de varias proteínas de la familia del VEGF: VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B<sub>167</sub> y PlGF1, aumentando su capacidad mitogénica. La expresión de NRP1 se ha convertido en un marcador de agresividad en cáncer de próstata, se ha relacionado con el aumento de la angiogénesis en melanomas, y con eventos de escape a la apoptosis en metástasis de cáncer de mama (Latil A et al. *Int J Cancer* 89:167, 2000; Lacal PM *J Invest Dermatol* 115:1000, 2000; Bachelder RE *Cancer Res* 61:5736, 2001). La sobre-expresión coordinada de NRP1, KDR y VEGF-A<sub>165</sub> se ha relacionado además con la proliferación fibrovascular en los casos de retinopatía diabética y artritis reumatoide (Ishida S. et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1649, 2000; Ikeda M. Et al. *J Pathol* 191:426, 2000). El NRP2 se sobre-expresa en osteosarcomas, donde promueve la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Handa A et al. *Int J Oncol* 17:291, 2000).
- La mayor parte de las estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de la angiogénesis, especialmente para cáncer, se basan en el bloqueo de las moléculas de la familia del VEGF y sus receptores, resaltando los ensayos clínicos en curso donde se emplean: (1) anticuerpos monoclonales bloqueadores del VEGF o del receptor KDR, (2) inhibidores de las metaloproteinasas, como el Neovastat y el Prinomastat, (3) inhibidores del VEGF como la Talidomida, el Suramin, la Troponina I, el IFN- $\alpha$  y el Neovastat, (4) bloqueadores de receptores del VEGF como los SU5416, FTK787 y SU6668), (5) inductores de apoptosis del endotelio tumoral como la Endostatina y el CA4-P, y (6) ribozimas que disminuyen la expresión del VEGF o de sus receptores (Angiozyme). Debido a la alta homología entre el VEGF humano y sus receptores Flt-1 y KDR con sus homólogos murinos (~90%, 81% y 89%, respectivamente), muchos modelos animales se emplean rutinariamente para evaluar la efectividad preclínica de los compuestos anti-angiogénicos dirigidos contra este sistema (Hicklin DJ et al. *DDT* 6:517, 2001).
- La administración pasiva de anticuerpos anti-VEGF o anti-VEGFR se ensaya con éxito en diferentes fases clínicas en humanos (Hicklin DJ et al. *DDT* 6:517, 2001). Un AcM humanizado anti-VEGF (A.4.6.1, Genentech, San Francisco, Estados Unidos) se encuentra en ensayo clínico fase III para el tratamiento de tumores de

- colon, mama, riñón, y pulmón (Kim, KJ et al. *Nature* 362:841, 1993; Boersig C. *R&D Directions* Oct 7:44, 2001). En particular, para el caso del receptor KDR se ha desarrollado un AcM (IMC-1C11, ImClone) que reconoce el dominio extracelular N-terminal de dicho receptor, e inhibe la proliferación y migración de células leucémicas humanas, alargando la vida de los ratones xenotransplantados. En la actualidad se estudia su efecto en pacientes con metástasis de cáncer de colon (Dias S et al. *J Clin Invest* 106:511, 2000). En los ensayos antes mencionados se ha demostrado la ausencia de efectos adversos concomitantes con la aplicación pasiva de estos AcMs (Hicklin DJ et al. *DDT* 6:517, 2001).
- 10 No obstante a lo anterior, una modalidad terapéutica no empleada aún para el bloqueo de la neo-angiogénesis es la inmunoterapia activa específica (IAE). En la IAE del cáncer se emplean como antígenos péptidos, proteínas o ADN, mezclados con adyuvantes apropiados. Los procedimientos de IAE persiguen estimular una respuesta inmune tanto de tipo humoral (activación de linfocitos B) como celular
- 15 (activación de linfocitos T citotóxicos y auxiliares, y de células asesinas naturales), asociada a la función de las células dendríticas, como presentadoras profesionales de antígenos en los contextos del tipo MHC I y II (Bystryk JC, *Medscape Hematology-Oncology* 4:1, 2001; Parker, KC et al., *J. Immunol* 152:163, 1994; Nestle FO et al., *Nature Medicine* 7:761, 2001; Timmerman JM, *Annual Review Medicine*
- 20 50:507, 1999).
- La IAE es un campo de investigación experimental y clínica en expansión acelerada, con aplicaciones muy atractivas, especialmente en la oncología donde se reportan más de 60 ensayos clínicos en curso basados en procedimientos de IAE, lo que supera en la actualidad los ensayos clínicos basados en anticuerpos monoclonales.
- 25 En el caso particular del cáncer, los antígenos usados como inmunógenos para la IAE se seleccionan por su relevancia fisiológica y dificultad de ser "sustituidos" en los procesos de deriva fenotípica tumoral (Bodey B et al., *Anticancer Research* 20: 2665, 2000), y por su alta asociación específica al crecimiento y desarrollo de los tejidos tumorales. La estrategia de tratamiento del cáncer mediante IAE considera
- 30 también preferente la identificación de antígenos que se expresen en diversos tipos de tumores, lo que incrementa el espectro de las indicaciones para un mismo preparado "vacunal". Ejemplos de todo ello son el antígeno carcinoembrionario (CEA), HER2-neu, la telomerasa humana, y los gangliósidos, (Greener M., *Mol Med Today* 6:257 2000; Rice J, et al. *J Immunol* 167:1558, 2001; Carr A et al, *Melanoma*
- 35 *Res* 11:219, 2001; Murray JL, et al. *Semin Oncol* 27:71, 2000).
- En los tumores humanos se sobre-expresa el VEGF en el compartimiento tumoral (Ferrara, N. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 237:1, 1999), y se ha demostrado un alto

contenido de VEGF y de sus receptores en la vasculatura asociada al tumor (Brekken RA. J Control Release 74:173, 2001). Las células pertenecientes al estroma también secretan VEGF en respuesta al estímulo de las células transformadas, de ahí que aún cuando se eliminan las células tumorales los niveles de VEGF persistan en los pacientes. La presencia de VEGF y de sus receptores posee ya un valor práctico para el establecimiento de pronósticos y estadiamiento en casos de tumores de próstata, cérvix y mama (George DJ et al. Clin Cancer Res 7:1932, 2001; Dobbs SP et al. Br J Cancer 76:1410,1997; Callagy G et al. Appl Immunohistochem Mol Morphol 8:104, 2000). Por otra parte, el VEGF se encuentra también entre los factores solubles que, junto a otras citocinas como la IL-10, el TNF- $\alpha$  y el TGF- $\beta$ , (Ohm JE y Carbone DP, Immunol Res 23:263, 2001), pueden estar implicados en la inmunosupresión que se observa en los pacientes de cáncer (Staveley K, et al. Proc Natl Acad Sci USA 95:1178, 1998; Lee KH, et al. J Immunol 161:4183, 1998). Este efecto "inmunosupresor" parece depender de su unión al receptor Flt1 (Gabrilovich D et al. Blood 92:4150, 1998).

La presente invención describe procedimientos de IAE en tumores experimentales empleando moléculas de la familia del VEGF y sus receptores. Los efectos anti-tumorales obtenidos pueden basarse en al menos cuatro mecanismos diferentes, sin descartar sus posibles combinaciones: (a) la destrucción directa de las células cancerosas y estromáticas que producen el VEGF por linfocitos citotóxicos, (b) la afectación de las células endoteliales de los vasos asociados al tumor debido al secuestro o neutralización del VEGF circulante mediante anticuerpos, (c) la destrucción directa de las células endoteliales que expresan receptores para el VEGF, mediante linfocitos citotóxicos o anticuerpos fijadores de complemento, (d) la activación de la respuesta inmune local mediante el secuestro o neutralización del VEGF circulante y la consiguiente eliminación de sus efectos inmunosupresores.

Idealmente, estos tratamientos pudieran servir para disminuir o evitar la aparición de metástasis, reducir o eliminar el tumor primario como terapia de primera o segunda línea, en asociación o no con otros agentes anti-tumorales.

La inmunización activa dirigida a la familia del VEGF y sus receptores también sería eficaz en la terapéutica única o combinada para el tratamiento de procesos inflamatorios agudos y crónicos (asma, distrés respiratorio, endometriosis, aterosclerosis, edemas tisulares), enfermedades infecciosas (Hepatitis, sarcoma de Kaposi), enfermedades autoinmunes (diabetes, soriasis, artritis reumatoide, tiroiditis, sinovitis), la retinopatía diabética y del recién nacido, rechazo al trasplante de órganos, la degeneración macular, los glaucomas neovasculares, hemangiomas y los angiofibromas, entre otros.



## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, la administración "*in vivo*" de secuencias oligonucleotídicas que codifican para proteínas de la familia del VEGF, sus  
5 receptores, co-receptores o fragmentos de las mismas, así como de sus variantes polipeptídicas; induce una respuesta inmune humoral y celular con un efecto antiangiogénico y antitumoral.

Los inmunógenos de naturaleza polipeptídica de interés para la presente invención, así como sus fragmentos, pueden ser aislados de sus fuentes naturales u obtenidos  
10 por vía sintética o recombinante. Estos polipéptidos también pueden producirse fusionados a proteínas con actividad adyuvante reconocida como la p64K (R. Silva et al US 5286484 y EP 0474313) o unirse a las mismas de forma covalente luego de su obtención individual. Otra estrategia disponible en estos casos es la obtención del polipéptido natural, sus variantes mutadas o modificadas, y sus fragmentos, como  
15 parte de lazos expuestos o no en proteínas bacterianas como la OMP1 que forman parte de preparaciones con actividad inmunoestimuladora, en este caso particular VSSP (R. Perez et al US 5788985 y 6149921). Es posible, además, obtener el inmunógeno polipeptídico expuesto en la superficie de una partícula viral (HbsAg, VP2 de parvovirus, etc.), unido a péptidos de unión a células u órganos  
20 especializados en la inducción de respuesta inmune (CTLA4, segmento Fc de Ig, etc.), o a proteínas capaces de aumentar la biodistribución, tales como VP22.

Las fuentes naturales principales de las proteínas de interés para esta invención se expresan predominantemente en la placenta, en células endoteliales activadas, y en células tumorales. El ARNm de estas células o tejidos se utiliza para obtener ADN  
25 complementario (ADNc) por métodos conocidos. El mRNA extraído se usa como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de los ADNc correspondientes al antígeno seleccionado. En cada caso se usan cebadores que se diseñan según las características del vector donde el ADNc va a ser insertado y de las secuencias previamente reportadas de las proteínas de interés.

De forma alternativa y sobre todo en el caso de los receptores amplificados por RCP, que son los antígenos de mayor talla que se utilizan en la presente invención, la región codificante es amplificada en dos o más fragmentos sobrelapados. Estos  
30 fragmentos incluyen un sitio de empalme común que permite el ensamblaje del ADN intacto a partir de sus fragmentos.

Una alternativa para el clonaje de los antígenos de interés es la selección a partir de librerías de ADN comerciales derivadas de endotelio humano o de tumores de este mismo origen. En algunos casos pudiera desearse mutar alguno de los antígenos

objeto de la presente invención de manera que, sobre todo en el caso de la familia del VEGF no ocurra un evento de inducción de la angiogénesis producto de la vacunación. Estas mutaciones se realizan dirigidas preferentemente hacia los sitios de unión con los receptores ya descritos en la literatura. Para ello se diseñan  
5 cebadores apropiados que cubren ambos extremos de la molécula deseada y cuyos productos se emplean como molde para obtener la molécula mutada. Estas variantes mutadas carecen de actividad biológica pero reproducen las propiedades inmunogénicas del antígeno seleccionado.

Las moléculas de ADNc obtenidas por los métodos descritos anteriormente son  
10 administradas mediante un vector que las porte, pudiendo ser este un virus, un plasmidio, un cromosoma artificial de bacteria, o similares. El vector porta los elementos necesarios para la expresión adecuada de dicho gen en la célula blanco, así como el resto de los elementos que le permiten ser obtenido en el sistema celular hospedero acorde con su naturaleza. Las moléculas de ADN de la presente  
15 invención pueden contener uno o más genes de interés, constituidos por uno más ácidos nucleicos (ADNc, ADNg, ADN sintético o semisintético, o similares), cuya transcripción y traducción (cuando sea apropiada) en la célula blanco genere los productos de valor terapéutico/vacunal.

Generalmente, el gen del producto terapéutico/vacunal de acuerdo a la invención, se  
20 encuentra bajo el control de un promotor transcripcional que es funcional en la célula blanco o el organismo (mamíferos), así como una región 3' terminal, que contiene las señales necesarias para la terminación y poliadenilación del ARNm del producto de interés, permitiendo su expresión. El promotor puede ser el promotor natural del gen empleado, o un promotor heterólogo, transcripcionalmente activo en la célula  
25 blanco. El promotor puede ser de genes eucariontes, o de origen viral. Entre los promotores eucariontes, es posible emplear cualquier promotor o secuencia derivada que estimule o reprima la transcripción del gen, específicamente o no, induciblemente o no, fuerte o débilmente. Adicionalmente, la región promotora puede ser modificada por inserción de secuencias activadoras o inductoras, permitiendo la  
30 expresión tejido-específica o predominante del gen en cuestión.

Además, el gen de interés puede contener una secuencia señal de localización subcelular, de manera que pueda modificarse su localización y/o secreción al medio extracelular, en la célula donde el mismo se expresa, o fuera de ella una vez sintetizado. También puede contener una región de unión específica a un ligando  
35 específico de tejido inmune, siendo dirigido hacia el sitio donde se genera la respuesta, obteniéndose el efecto terapéutico / vacunal.

Adicionalmente, el gen de interés puede estar precedido de la secuencia codificante para una maquinaria replicativa del ARNm, de manera que permita la amplificación del ARNm en la célula blanco, incrementando la expresión de dicho gen, y con ello el efecto terapéutico/vacunal de acuerdo a la invención. La maquinaria replicativa en cuestión puede ser de origen alfaviral (Schlesinger S., Expert Opin Biol Ther. 1:177, 2001), más específicamente, derivada del virus Sindbis o Semliki, o similares. En este caso particular, el gen de interés se encuentra bajo el control transcripcional de un promotor subgenómico, que permite la amplificación de su ARNm dentro de la célula blanco, una vez que las moléculas de acuerdo a la presente invención han sido internalizadas. El vector de ADN puede contener, además, secuencias que permitan la replicación en células de mamíferos de las moléculas de la presente invención. Ello permite incrementar los niveles de expresión y/o el efecto terapéutico / vacunal (Collings A., Vaccine 18: 4601, 1999).

El vector de ADN puede ser purificado mediante las técnicas estándar para la purificación de ADN plasmídico. Estas técnicas comprenden el método de purificación en gradiente de densidad por cloruro de cesio, en presencia de bromuro de etidio, o alternativamente, el uso de columnas de intercambio iónico o cualquier otro intercambiador o método para la separación de moléculas de ADN (Ferreira GN, et al, Trends Biotechnol. 18:380, 2000).

La presente invención comprende el uso de vectores de ADN plasmídico, preferentemente los pertenecientes a la familia pAEC, de vectores compactos para inmunización con ADN y terapia génica en humanos (Herrera et al, Biochem. Biophys. Res. Commu. 279: 548, 2000). Estos comprenden específicamente los vectores pAEC-K6 (Número de acceso AJ278712), pAEC-M7 (Número de acceso AJ278713), pAEC-Δ2 (Número de acceso AJ278714), pAEC-SPE (Número de acceso AJ278715) y pAEC-SPT (Número de acceso AJ278716). Estos vectores contienen sólo los elementos imprescindibles para la expresión del producto de interés en células de mamíferos, incluidas células humanas, y una unidad de replicación en *Escherichia coli*. La unidad transcripcional está compuesta por el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano, un sitio múltiple de clonaje versátil para la inserción del producto de interés, y la secuencia de terminación transcripcional y poliadenilación derivada del virus de simio 40 (SV40). En la unidad replicativa, el vector contiene el gen de resistencia a kanamicina (*Tn903*) y un origen de replicación pUC19 (*ColE1*), para garantizar un alto número de copias y la selección de la bacteria que porta el plasmidio de interés.

Además, la presente invención comprende el uso de vectores de ADN plasmídico, preferentemente los pertenecientes a la familia pMAE, de vectores compactos para

inmunización con ADN en humanos. Estos contienen los mismos elementos funcionales en bacteria, que los vectores de la serie pAEC, así como el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano y el sitio múltiple de clonaje. Además, portan un intrón sintético, y una secuencia sintética de terminación de la transcripción y poliadenilación, derivada de la globina  $\beta$  de conejo. Se ha reportado que secuencias similares a esta últimas permiten obtener mayores niveles de expresión del gen clonado (Norman JA et al, Vaccine 15: 801,1997). Adicionalmente, los vectores de esta serie portan repeticiones consecutivas de secuencias inmunoestimuladoras (motivos CpG), que estimulan al sistema inmune innato de ratones y humanos, con la consiguiente activación de respuesta humoral y celular contra la molécula de interés (Krieg AM, Vaccine 19:618, 2001).

La inmunización con virus recombinantes (adenovirus, adeno-asociados, vaccinia, virus de la viruela aviar, virus de la viruela de canario, entre otros) produce una respuesta celular citotóxica potente en los hospederos. Para introducir la secuencia de interés en los virus recombinantes se utilizan vectores que poseen secuencias de integración y promotores particulares para cada especie viral. Esta estrategia también se incluye dentro del alcance de la presente invención, y se utiliza preferentemente el virus de la viruela aviar y el vector pFP67xgpt. Este vector se emplea para el clonaje de genes bajo un promotor fuerte temprano / tardío de naturaleza sintética entre los marcos de lectura abierto 6 y 7 de un fragmento de 11.2kB BamHI del virus de viruela aviar FP9. Este plásmido además contiene el gen Ecogpt controlado por el promotor de vaccinia p7.5K que se utiliza para identificar los virus recombinantes.

Otra alternativa de la presente invención consiste en la inmunización con proteínas de la familia del VEGF, sus receptores y/o correceptores. Las moléculas de ADNc obtenidas por los métodos descritos anteriormente son clonadas en vectores de expresión en virus bacterias, levaduras, fagos, plantas o células superiores, para obtener las variantes proteicas de los antígenos, después de haberse verificado su secuencia empleando los métodos tradicionales de secuenciación automática. Varios vectores de expresión han sido descritos y empleados para la obtención de proteínas recombinantes. Estos vectores contienen al menos una secuencia controladora de la expresión que está unida operativamente a la secuencia del ADN o fragmento que se desee expresar. Ejemplos de secuencias útiles en el control de la expresión son: los sistemas lac, trp, tac, y trc, las regiones promotoras y el operador principal del fago lambda, la región controladora de la proteína de superficie fd, los promotores glicolíticos de levadura (por ejemplo el de la 3 fosfoglicerato quinasa), los promotores de la fosfatasa ácida de levadura (por

ejemplo Pho5), los promotores de levadura del factor de unión alfa y los promotores derivados de poliomavirus, adenovirus, retrovirus, virus simios (por ejemplo los promotores tempranos y tardíos del SV40) y otras secuencias conocidas que regulan la expresión de genes en células procariotas o eucariotas, sus virus y sus combinaciones.

Los hospederos que se emplean para la replicación de estos vectores y la obtención de proteínas recombinantes objeto de esta invención incluyen células procariotas y eucariotas. Entre los procariotas se incluyen: *E. Coli* (DHI, MRCI, HB101, W3110, SG-936, X1776, X2282, DH5a), *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, y otros. En el caso de las células eucariotas, se incluyen levaduras y hongos, insectos, células animales como por ejemplo COS y CHO, células humanas y de plantas y cultivos de tejidos, entre otros. Seguidamente a la expresión en el sistema escogido en un medio adecuado, los polipéptidos o péptidos pueden ser aislados por métodos conocidos.

#### Uso de adyuvantes

Aún cuando la vacunación con ADN desnudo o proteínas ha demostrado ser efectiva en ciertos modelos animales, los pacientes afectados por tumores o enfermedades autoinmunes, representan un reto para la estrategia terapéutica que propone la presente invención. Con el objetivo de favorecer el desarrollo de la respuesta inmune las vacunas de ADN o proteína pueden ser combinadas con inmunopotenciadores ya descritos como por ejemplo: Sales minerales (Ej., Hidróxido de aluminio, Fosfato de aluminio, Fosfato de calcio); inmunoestimuladores como: citocinas (Ej., IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-18), moleculares (CD40, CD154, cadena invariante de MHC tipo I, LFA3); saponinas (Ej., QS21), derivados de MDP, oligonucleótidos CpG, LPS, MPL y polifosfasenos; partículas lipídicas como: emulsiones (Ej., Freund, SAF, MF59), liposomas, virosomas, iscoms, coquelatos; adyuvantes microparticulados como micropartículas PLG, poloxámeros, de tipo viral (Ej., HBcAg, HCCAg, HBsAg) y de tipo bacteriano (Ej., VSSP, OPC); y adyuvantes mucosales como enterotoxina termolábil, toxina del cólera, toxinas mutantes (Ej., LTK63 y LTR72), micropartículas y liposomas polimerizados. En el caso de la vacunación con ADN pudiera combinarse la expresión del antígeno de interés con alguna de las moléculas inmunopotenciadoras ya mencionadas en un vector de vacunación dicistrónico.

En las situaciones experimentales que se detallan en los ejemplos se demuestra que el ADN puede acoplarse no covalentemente a algunas de las partículas mencionadas y que el uso de estas mezclas disminuye la concentración óptima para

obtener respuesta antitumoral similar a la descrita para dosis superiores de ADN desnudo.

#### **Administración a un mamífero**

- 5 Para aplicaciones terapéuticas, las preparaciones vacunales de la presente invención son administradas a un mamífero, preferentemente un humano, en una dosis farmacéuticamente aceptable por las siguientes vías: mucosal, subcutánea, intramuscular, peritoneal, intralinfática, tópica, y por inhalación, entre otras. Puede ser administrada en el espacio intersticial de tejidos, incluyendo a: músculo, piel,
- 10 cerebro, pulmón, hígado, médula ósea, bazo, timo, corazón, linfonodos, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vejiga, estómago, intestino, testículos, ovario, útero, recto, ojo, glándulas y tejido conectivo. En el caso de los vectores que transfieren oligonucleótidos, su expresión es preferentemente dirigida a células somáticas diferenciadas, aunque pudiera también dirigirse a células no diferenciadas
- 15 o con una menor diferenciación como los fibroblastos de la piel y las células pluripotenciales presentes en la sangre.

Las dosis del inmunógeno pueden ser administradas en vehículos aceptados para el uso farmacéutico que no son tóxicos ni presentan efectos terapéuticos. Los ejemplos de estos vehículos incluyen a los intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de

20 aluminio, lecitina, proteínas séricas, como la albúmina, sustancias tampones, como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas glicéridas parciales de ácidos grasos saturados de origen vegetal, agua, sales, o electrolitos como el sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, cloruro de sodio, sales de zinc, sílica coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias basadas en la

25 celulosa, y polietilén glicol. En la presente invención se utilizan preferentemente tampones fosfato como vehículos de las preparaciones vacunales.

En el caso del uso de proteínas y péptidos estos pueden conjugarse de forma covalente o no a moléculas conocidas como portadoras que funcionan como adyuvantes. Entre estas moléculas se encuentran la KLH, la p64K, la OPC

30 (Musacchio A et al, Vaccine 19; 3692, 2001), las VSSP. La combinación de inmunizaciones de ADN desnudo, vectores virales e inmunógenos proteicos es una alternativa que también se incluye dentro del alcance de la presente invención.

Ventajosamente, la administración de ADN plasmídico permite generar formulaciones con una o más moléculas de interés en el preparado vacunal. Así

35 mismo, las moléculas de acuerdo a la presente invención pueden ser administradas en esquemas vacunales mediante combinación de diferentes tipos de vectores (variante de inducción reestimulación, con ADN, proteínas, vectores virales).

- Los vectores de ADN pueden ser administrados directamente al paciente, o las células de este pueden ser modificadas *in vivo* o *ex vivo* con estos vectores. Esta última estrategia puede ser combinada con la inserción por recombinación sitio-específica o inmunización por transgénesis somática que dirige la expresión del vector a células específicas. Además los hospederos bacterianos de los vectores de ADN pueden ser empleados como sus vehículos de transferencia *in vivo*.
- De esta forma, las moléculas que portan los genes de acuerdo a la invención pueden ser usadas en forma de ADN desnudo, o en combinación con diferentes vectores químicos / bioquímicos / biológicos, naturales/sintéticos o recombinantes.
- Pueden ser acomplejadas con péptidos catiónicos, moléculas compactadoras (Ej. PEG, PEI), péptidos de localización nuclear (NLS), etc. Pueden administrarse además junto a cationes capaces de formar precipitados con el ADN, como parte de preparaciones liposomales a la que se añaden previo a la fusión de las membranas, y en vectores sintéticos de naturaleza lipídica o formados por polímeros catiónicos (Ej., DOGS o DOTMA). Para la administración de los vectores de ADN pueden utilizarse además, proteínas quiméricas capaces de compactar el ADN y mediar el transporte del complejo formado y su endocitosis selectiva en las células específicas. Las moléculas de ADN portando los genes terapéuticos/vacunales de acuerdo a la invención, pueden ser empleadas para transferencia génica a células empleando métodos físicos de transferencia, tales como el bombardeo de partículas, electroporación (*in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*), o directamente *in vivo* mediante aplicación tópica, inhalación por particulación, etcétera. Los vectores vivos comprenden partículas adenovirales o los propios hospederos donde se generan las moléculas de acuerdo a la presente invención.
- Las dosis de polipéptidos y/u oligonucleótidos a emplear pueden establecerse de acuerdo a diferentes parámetros, en particular dependiendo del gen o proteína administrada como inmunógeno, del modo de administración, de la patología en cuestión, del período de tratamiento y en el caso del uso de oligonucleótidos del vector empleado para la inmunización. Un cambio en el intervalo de dosis o una ruta de administración diferente de las descritas en los ejemplos que siguen, no se apartan del principio o precepto de la presente invención, siendo posible lograr una optimización de los esquemas de inmunización para obtener una mejor respuesta.

#### **Uso terapéutico**

- Esta invención tiene ventajas respecto a los procesos de inmunoterapia pasiva que se encuentran en fases adelantadas de ensayos clínicos utilizando como blancos las mismas moléculas. En comparación con la transferencia pasiva de inmunidad a

través de la administración de anticuerpos monoclonales (Ej., anti-VEGF), la inmunización, ya sea con la proteína o con el oligonucleótido, tiene la ventaja de inducir la producción de anticuerpos endógena, además de la proliferación y expansión de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos.

- 5 La presente invención posee ventajas sobre las estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear el sistema del VEGF y sus receptores, debido a que estas estrategias únicamente disminuyen los niveles de VEGF circulante o bloquean el receptor KDR. La estrategia que se propone, además de lograr los efectos antes mencionados, destruye las fuentes del VEGF (es decir, la célula tumoral y el estroma asociado) y/o
- 10 las células que expresan sus receptores (endotelio tumoral y algunas células tumorales). Los trabajos previos realizados en esta área sólo describen una respuesta humoral como componente esencial del efecto observado. Sin la intención de limitar el alcance de la presente invención a un mecanismo particular, los ejemplos demuestran que, además de una respuesta humoral específica las
- 15 composiciones vacunales que se utilizan inducen una respuesta celular CD8+ que coopera con la humoral y que en el contexto tumoral es relevante la combinación de ambas para obtener un efecto antitumoral, lo anterior se evidencia en el ejemplo 9. Es posible que la respuesta celular tipo citotóxica sea mediada por el reconocimiento de alguno de los péptidos que aparecen en las tablas 1 y 2. En la misma aparecen
- 20 algunos segmentos peptídicos que pudieran ser relevantes en la respuesta celular dirigidas a los blancos seleccionados en la familia del VEGF, sus receptores y co-receptores. Esta información se obtuvo a través del análisis en las bases de datos del NIH y el Instituto de Heidelberg con los programas BIMAS y SYFPHEITI, respectivamente. ([http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla\\_bind](http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind) y [www.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm](http://www.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm)). Los péptidos señalados y otras
- 25 secuencias derivadas de los antígenos de interés pueden ser utilizados para la inmunoterapia activa en las patologías previamente descritas, de manera individual o combinadas como parte o no de moléculas con capacidades adyuvantes. Estos péptidos pueden ser utilizados también en sus variantes oligonucleotídicas con
- 30 propósitos vacunales.
- Los métodos para inhibir la angiogénesis y condiciones patológicas asociadas a la misma, comprenden la administración de una cantidad efectiva del ADN o proteína de alguna de las moléculas descritas en esta invención por alguna de las rutas y con el uso de alguno de los inmunopotenciadores o adyuvantes descritos anteriormente,
- 35 a un mamífero. Este mamífero es preferentemente un humano. Un aumento no reversible y no regulado de la angiogénesis se ha asociado a un amplio grupo de enfermedades. El sistema que comprende a la familia del VEGF, sus receptores y co-



receptores se sobre-expresa en muchas de estas condiciones patológicas como ya ha sido detallado. De esta forma, las estrategias terapéuticas que propone esta invención resultan efectivas en el tratamiento de: (a) el cáncer (tanto los tumores primarios como sus metástasis), (b) procesos inflamatorios agudos y crónicos como el asma, el distrés respiratorio, la endometriosis, la aterosclerosis, y los edemas tisulares, (c) enfermedades de origen infeccioso como las Hepatitis y el sarcoma de Kaposi, (d) enfermedades autoinmunes como la diabetes, la soriasis, la artritis reumatoide, la tiroiditis, y (e) otras varias enfermedades y estados tales como la retinopatía diabética y del recién nacido, el rechazo al transplante de órganos, la degeneración macular, los glaucomas neovasculares, los hemangiomas y los angiofibromas.

En particular en el caso del cáncer la vacunación con los inmunógenos que propone la presente invención resulta efectiva en el tratamiento de carcinomas, sarcomas y tumores vascularizados. Algunos ejemplos de tumores que pueden ser tratados con las estrategias que se proponen incluyen: tumores epidermoides, tumores escamosos como los de cabeza y cuello, tumores colorectales, de próstata, de mama, de pulmón incluyendo los de células pequeñas y no pequeñas, de páncreas, tiroides, ovario e hígado. Estos métodos resultan también efectivos en el tratamiento de otros tipos de tumores, como: el sarcoma de Kaposi, las neoplasias del sistema nervioso central (neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales), melanomas, carcinomas renales y gastrointestinales, rhabdomyosarcoma, glioblastomas, y leiomyosarcomas.

En específico, el uso del VEGF-A y/o su receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 como inmunógeno resulta de utilidad en el tratamiento: de tumores de diferente origen y localización y sus metástasis, de los hemangiomas, de la endometriosis, de edemas tisulares, de procesos inflamatorios crónicos como la colitis ulcerativa y enfermedad de Chron, de la aterosclerosis, de la artritis reumatoide y la osteoartritis, de las artropatías inflamatorias, de la soriasis, del distrés respiratorio, del asma, de la tiroiditis, de la retinopatía diabética y del recién nacido, de la degeneración macular y los glaucomas, de la enfermedad autosómica VHL, de la obesidad, y del rechazo a algunos trasplantes de órganos. Por su parte, una respuesta inmune contra el PIGF resulta de utilidad en casos de artritis reumatoides y en general en el tratamiento de las artropatías inflamatorias primarias.

En el caso del VEGF-B su uso como inmunógeno resulta útil en casos de tumores de mama, ovario, riñón, melanoma, y los fibrosarcomas. El uso del VEGF-C y su receptor VEGFR-3 es de utilidad en el tratamiento de edemas tisulares, de la retinopatía diabética, de la inflamación crónica, de las úlceras y de tumores de

mama, pulmón, cabeza y cuello, esófago, estómago, linfomas, próstata, nódulos metastásicos y del sarcoma de Kaposi, los hemangioendoteliomas tipo Dabska y de la linfangiomatosis cutánea. La inmunización con VEGF-D puede utilizarse de manera específica para el tratamiento de metástasis en nódulos linfáticos

- 5 El uso de los correceptores NRP1 y NRP2, en la inmunización de mamíferos, resulta útil en el tratamiento en particular: de la proliferación fibrovascular en los casos de cáncer de próstata, de melanomas, de osteosarcomas, y de metástasis de cáncer de mama, así como de la retinopatía diabética y artritis reumatoide.

- 10 Los estudios basados en la inmunoterapia pasiva por administración de anticuerpos han demostrado que la combinación de anticuerpos contra VEGF-A y KDR, resulta más efectiva en modelos de tumores singénicos. De esta forma, el uso de dos o más de los inmunógenos que propone la presente invención ofrece un tratamiento especialmente eficiente para la inhibición de la angiogénesis y del crecimiento tumoral. Estos inmunógenos pueden administrarse de manera individual o por pares
- 15 utilizando vectores dicistrónicos por las vías ya mencionadas. Además las composiciones vacunales de la invención pueden usarse junto a, o en forma secuencial con drogas o agentes quimioterapéuticos que ofrezcan un beneficio para la condición bajo tratamiento.

- 20 Los resultados que se describen posteriormente demuestran que la respuesta antiangiogénica y antitumoral es mediada por una cooperación de las respuestas humoral y celular. En particular el VEGF y su receptor Flt1 intervienen en los procesos de maduración de células dendríticas y actúan sobre los precursores de linfocitos B y T. En el ejemplo 10 se demuestra que la estrategia terapéutica propuesta, además de disminuir los niveles de VEGF en suero, contribuye a la
- 25 normalización de las proporciones de linfocitos B y T y de células dendríticas maduras. Este efecto favorece la presentación de antígenos tumorales en el sistema MHC I, lo que mejora la calidad e intensidad de la respuesta inmune antitumoral, dirigida no solamente al inmunógeno sino al resto de los antígenos tumor asociados, tumor específicos y sobre-expresados en el contexto tumoral.

### **B.-Empleando el programa SYFPEITHI**

VEGF-A			VEGF-B		VEGF-C		VEGF-D		PIGF	
Secuencia	Score	Secuencia	Score	Secuencia	Score	Secuencia	Score	Secuencia	Score	
LLSWVHWSL	24	LLLAALLQL	29	TLFEITVPL	27	FMMLYVQLV	25	ALERLVDVV	26	
ALLYLHHA	24	QLAPAQAPV	26	DLEEQLRSV	26	QLFEISVPL	25	RLPFCFLQL	24	
WVHWSLALL	20	QLVPSCVTV	26	YLSKTLFEI	26	YISKQLFEI	24	RALERLVDV	24	
SLALLYLH	20	VWPLTVEL	24	ALLPGPREA	24	KLWRCRLRL	23	LLAGLALPA	22	
SYCHPIETL	19	LLRRLLLA	23	CMNTSTSYL	21	RAASSLEEL	22	LAGLALPAV	22	
NITMQIMRI	19	LLAALLQLA	23	DICGPNKEL	21	SLEELLRIT	22	VMRLFPCFL	20	
FLLSWVHWS	18	FLRCQGRGL	22	AAAFESGL	20	ATFYDIETL	22	CFLQLLAGL	20	
WSLALLYL	18	LTVELMGTV	21	AAFESGLDL	20	EISVPLTSV	22	QLLAGLALP	20	
HPIETLVDI	18	LRRLLLAAL	20	VLYPEYWKM	20	SLICMNTST	20	SAGNGSSEV	20	
CNDEGLECV	18	LMGTVAKQL	19	IIRSLPAT	20	VPLTSVPEL	20	VVSEYPSEV	20	

**Nota:** Se señalan en negritas los valores de aquellos péptidos o regiones de los mismos, que coinciden en las dos predicciones.

Tabla 2. Estimación de péptidos asociados al MHC tipo I en el contexto del HLA-A.0201 del grupo de receptores de la familia de proteínas del VEGF

A.-Empleando el programa BIMAS														
VEGFR-1			VEGFR-2			VEGFR-3			NRP-1			NRP-2		
Secuencia	Kd		Secuencia	Kd		Secuencia	Kd		Secuencia	Kd		Secuencia	Kd	
FLYRDVTWI	1942		VLLWEIFSL	1792		VLLWEIFSL	1793		GLLRFVTAV	2249		WMYDHAKWL	5121	
VLLWEIFSL	1792		SLQDQGDYV	769		RLEEKSGV	1055		VLLGAVCGV	1006		ILQLIFDL	484	
KLLRGHTLV	901		VLLAVALWL	739		VLWPDGQEV	981		WMPENIRLV	436		YLQVDLRFL	247	
GLLTCEATV	257		AMFFWLLLV	427		NLTDLLVNV	656		GILSMVFYT	278		ALYFSRHQV	223	
TLFWLLLT	182		VIAMFFWLL	270		KQAERGKVV	557		LLCAVLALV	272		NMLGMLSGL	131	
ILLSENNIV	179		ILLSEKNV	179		GVIATFFWV	369		VLLHKSLL	134		WLYTLDPIL	129	
TLNLTIMNV	160		LLAVALWLC	146		KLVIQNAV	243		GMLGMVSG	131		DIWDGIPHV	56	
CVAATLFWL	137		KNLDTLWKL	128		ALWNSAAGL	177		FQLTGGTTV	120		KMEILQFL	44	
LLSIKQSNV	118		AVIAMFFWL	113		TLSSLIPRV	160		VLATEKPTV	118		VLNKLHAPL	36	
SLQDSGTYA	112		LLLVIILRT	108		SQHDLGSYV	159		GPFLFIKVV	81		LLGATCAGL	36	
B.-Empleando el programa SYFPEITHI														
VEGFR-1			VEGFR-2			VEGFR-3			NRP-1			NRP-2		
Secuencia	Score		Secuencia	Score		Secuencia	Score		Secuencia	Score		Secuencia	Score	
TLFWLLLT	29		VLLWEIFSL	29		VLLWEIFSL	29		VLLGAVCGV	30		NMLGMLSGL	27	
VLLWEIFSL	29		LLVIILRTV	28		SIPGLNVTL	27		GLLRFVTAV	29		ILQLIFDL	26	
ILPGSSTL	28		GLFCKTLTI	26		NLTDLLVNV	27		LLCAVLALV	28		DIWDGIPHV	26	
LLCALLSCL	27		SIMYIVAVV	26		VLWPDGQEV	26		GMLGMVSG	28		YLQVDLRFL	26	
GLLTCEATV	27		IILVGTAVI	26		LLPRKSLEL	26		ALGVLLGAV	28		TLDPIITI	26	
LLRGHTLV	27		ALMSELKIL	26		ALWNSAAGL	26		VLLHKSLL	27		ILAKPKMEI	25	
ALMTELKIL	26		AASVGLPSV	25		IMDPGEVPL	26		VLATEKPTV	26		VLNKLHAPL	25	
KLLRGHTLV	25		SISNLNVSL	25		RLWLCGLL	25		QLTGTTVL	25		LLGATCAGL	25	
TLNLTIMNV	25		AMFFWLLLV	25		LIYFYVTI	25		VLLGAVCGV	30		ALYFSRHQV	23	
ILLSENNIV	25		ILLSEKNV	25		LLEGQPVLL	25		GLLRFVTAV	29		GIGMRLEVL	23	

Nota: Se señalan en negritas los valores de aquellos péptidos o regiones de los mismos, que coinciden en las dos predicciones.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### Clonaje y expresión transciente de los antígenos.

##### VEGF humano, sus isoformas y mutantes funcionales

- 5 Para el clonaje de las isoformas del VEGF se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) usando como molde el ADN complementario de un aislamiento previo de ARNm de la línea celular CaSki (ATCC CRL 1550), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Perkin-Elmer) y con el empleo de los cebadores SEQ ID1 y SEQ ID2. Las bandas correspondientes a los productos de la amplificación de
- 10 las isoformas del VEGF 121, 165 y 189 fueron extraídas de geles de agarosa al 2%. Luego de la digestión de las bandas con las endonucleasas BamH1 y EcoR1, el ADNc de las isoformas fue purificado y clonado de manera independiente en el pAECΔ2, vector propietario del CIGB. Los plasmidios resultantes fueron secuenciados y se determinó que estos no contenían mutaciones con respecto a las
- 15 secuencias de aa reportadas en el EMBL ([www.embl-heidelberg.de](http://www.embl-heidelberg.de)) para las isoformas clonadas. Seguidamente los ADNc correspondientes a las isoformas del VEGF se sub-clonaron KpnI/EcoRV en el vector pMAE5Δ5, que, entre otras características, difiere del pAECΔ2 en la presencia de 5 sitios CpG inmunoestimuladores.
- 20 Se obtuvo el ADNc de una variante deficiente para la unión al receptor KDR (VEGF<sub>KDR(-)</sub>) por mutagénesis dirigida de la isoforma VEGF<sub>121</sub> ya clonada, como se ha descrito por Siemeister G y col (Siemeister G et al. J Biol Chem 273:11115, 1998). La variante mutada se generó por RCP utilizando los siguientes cebadores:
- 25 (A) Amplificación del fragmento 5' terminal (315 bp): empleando los cebadores con la secuencia SEQ ID3 e SEQ ID4
- (B) Amplificación del fragmento 3' terminal (93bp): empleando los cebadores con la secuencia SEQ ID5 e SEQ ID6
- Los fragmentos así amplificados se purificaron como ya se ha referido y fueron usados en condiciones equimolares como molde para una RCP de fusión usando los
- 30 cebadores correspondientes a la secuencia SEQ ID7 e SEQ ID8. El ADNc resultante que contiene la mutación se digirió BamH1 / EcoR1, y fue purificado y clonado en el vector pAECΔ2. Las mutaciones introducidas se chequearon por secuenciación, y el ADNc correspondiente al VEGF<sub>KDR(-)</sub> se sub-clonó KpnI/EcoRV en el vector pMAE5Δ5, resultando el pMAE5Δ5 VEGF<sub>KDR(-)</sub>.
- 35 Los plasmidios utilizados tanto en los ensayos de transfección como en la vacunación de animales se purificaron en condiciones libres de endotoxina, como ha

sido descrito por Whalen R. y col (Whalen RG y Davis HL. Clin Immunol Immunopathol 75:1, 1995). Brevemente, el ADN se purificó utilizando los sistemas QUIAGEN libres de endotoxinas de acuerdo a las instrucciones del fabricante, sometándose el ADN, posteriormente, a una segunda precipitación. Finalmente el  
5 ADN quedó disuelto en PBS libre de endotoxinas (SIGMA, USA) a una concentración final de 4 mg/mL

### 1.2 Receptor del VEGF humano (KDR/Fik1)

Los ADNc que codifican para los dominios 1-3 extracelulares del receptor KDR del  
10 VEGF (KDR1-3) y para el dominio transmembrana e intracelular del propio receptor (KDR TC) se obtuvieron a partir de un RT-PCR sobre ARNm de células endoteliales HUVEC (Clonetic, USA) tratadas con VEGF humano (Sigma) y Heparina (Sigma).

En el caso de los dominios extracelulares del 1 al 3 se emplearon cebadores que corresponden con las secuencias SEQ ID9 e SEQ ID10. Luego de la digestión del  
15 fragmento amplificado (943 pb) con las endonucleasas BamHI y EcoRI, el ADNc de los dominios 1-3 del KDR se purificó y clonó en el vector pAECΔ2. Los clones positivos por análisis de restricción se verificaron por secuenciación del ADN correspondiente. Seguidamente el ADNc correspondiente al KDR1-3 se sub-clonó KpnI/EcoRV en el vector pMAE5Δ5 ya descrito (pMAE5Δ5 KDR1-3).

20 Para el clonaje de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor, se diseñó una estrategia de inserción de dicha zona en dos pasos. Para la inserción del primer segmento se emplearon los cebadores que corresponden con las secuencias SEQ ID11 e SEQ ID12. Luego de digerir esta banda de 747 pb XbaI/BglII el producto se clonó en el vector pMAE5 previamente digerido con las mismas enzimas,  
25 obteniéndose el vector PMAE5 KDR 747. Este vector fue digerido BglII/NotI para insertar el fragmento carboxilo terminal de 1091pb restantes que se amplificaron con al utilización de los cebadores que corresponden con las secuencias SEQ ID13 e SEQ ID14 Los clones positivos por análisis de restricción se verificaron por secuenciación de ADN y se denominaron pMAE5 KDR C.

30 1.2.1 Clonaje de la zona transmembranaria y citosólica del KDR humano en un vector viral.

Para el clonaje de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor del VEGF (KDR) en el virus de viruela aviar, se emplearon los cebadores correspondientes con las secuencias SEQ ID15 e SEQ ID16. Luego de digerir esta banda de 953 pb  
35 StuI/SmaI el producto se clonó en el vector pFP67xgpt previamente digerido con las mismas enzimas. En este propio vector digerido SmaI/BamHI se insertaron los 919pb restantes que se ampliaron del ADNc original usando los cebadores con la

secuencia descrita en SEQ ID17 e SEQ ID18. Los clones positivos por análisis de restricción se verificaron por secuenciación de ADN y se denominaron pFP67xgpt KDR C.

Los virus de viruela aviar (FWPVs) se replicaron en fibroblastos de embrión de pollo (FEP) en medio DMEM suplementado con 2% de suero fetal bovino. El pFP67xgpt KDR C se transfectó utilizando lipofectina (Gibco BRL, Grand Island, USA) en FEP previamente infectados con la cepa atenuada FP9. Después de 24 horas se añadió medio fresco y las células se cultivaron por tres o cuatro días más. Después de este tiempo las células se congelaron y descongelaron tres veces. Los virus recombinantes que expresaban el gen codificante para la enzima Ecogpt se purificaron en medio selectivo con ácido micofenólico (25 µg/mL), xantina (250 µg/mL) e hipoxantina (15 µg/mL) (MXH). La inclusión correcta del gen en los virus recombinantes se chequeó por RCP. Los virus recombinantes se denominaron FPKDRgpt y los no recombinantes utilizados como control negativo FP.

15

## Ejemplo 2

### Expresión "*in vivo*" de los antígenos.

Con el objetivo de confirmar la potencialidad de las construcciones realizadas para expresar las proteínas "*in vivo*", las mismas se inyectaron en el músculo cuádriceps femoral de ratones C57BL6 (3 por grupo)

1. pMAE5Δ5- VEGF<sub>121</sub> (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
2. pMAE5Δ5- VEGF<sub>165</sub> (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
3. pMAE5Δ5- VEGF<sub>189</sub> (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
4. pMAE5Δ5- VEGF<sub>KDR(-)</sub> (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
- 25 5. pMAE5Δ5- KDR 1-3 (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
6. pMAE5 KDR C (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
7. FPKDRgpt ( $2.5 \times 10^7$  ufp) en PBS pH 7.2
8. PBS pH 7.2 (control negativo)

Después de 48 horas los animales fueron sacrificados y los músculos inyectados se extrajeron en una pieza. Una parte del tejido muscular fue homogenizado en presencia de inhibidores de proteasas y detergentes no iónicos. La presencia de VEGF en los extractos proteicos se analizó por Dot Blot y Western Blot utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce todas las isoformas del VEGF humano (sc-152G), siguiendo procedimientos ya descritos. Del tejido muscular restante se extrajo el ARN total utilizando TRI-Reagent (SIGMA). Un total de 20 µg de ARN por situación experimental, se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa al

35

1% con formaldehído. El ARN fue transferido a un filtro de nylon (Hybond) e hibridado con el ADNc de la isoforma 121 del VEGF marcada con ATP<sup>32</sup>, la cual reconoce todas las isoformas del VEGF o con el ADNc del KDR igualmente marcado. En ambos casos los filtros fueron rehibridados con un fragmento de ADNc correspondiente a un gen constitutivo: la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En todas las construcciones ensayadas se identificaron las bandas correspondientes a las isoformas del VEGF humano y los fragmentos del receptor KDR clonados.

### 10 Ejemplo 3

**Experimentos de protección *in vivo* empleando la vacunación con el plasmidio que contiene los fragmentos del gen del KDR, receptor del VEGF.**

Grupos de 10 ratones C57BL/6 fueron vacunados o no, con las siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-KDR 1-3 (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
- 15 2. pMAE5 KDR C (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
3. FPKDRgpt ( $2.5 \times 10^7$  ufp)
4. PBS pH 7.2 (control negativo)
5. FP ( $2.5 \times 10^7$  ufp) (control negativo grupo 3)

En todos los casos, la inmunización fue por vía im en la pata trasera izquierda con un volumen de 50 µL totales. Todos los animales fueron reinmunizados a los 15 días empleando el mismo régimen de la inmunización original. El reto tumoral se desarrolló 30 días después de la última inmunización, con la inoculación subcutánea de  $10^4$  células del melanoma B16 F10 (ATCC, CRL-6475) en la zona ventral derecha de todos los animales. Se realizó el monitoreo del crecimiento tumoral con tres mediciones semanales hasta que comenzaron a morir los ratones.

En los ratones inmunizados con el plasmidio pMAE5Δ5-KDR 1-3 se evidenció una reducción del tamaño tumoral a las dosis de 50 y 100 µg de ADN/ratón, significativamente menor respecto al control negativo (Tabla 3). Un análisis de sobrevida en el día 33 evidenció un aumento significativo (con respecto al control negativo) de este parámetro para los ratones inmunizados con dichas dosis de 50 y 100 µg de ADN por animal (Tabla 3) con respecto a los ratones no inmunizados (grupo PBS pH7.2). En el caso del pMAE5Δ5-KDR C (Tabla 3) se evidenció una disminución significativa del volumen tumoral en las cuatro concentraciones empleadas con aumento en la sobrevida a las dosis de 100 a 10 µg/animal. El empleo de vectores virales redujo volumen y aumento sobrevida en la condición ensayada para la construcción FPKDRgpt (Tabla 4) en comparación con su



respectivo control negativo (grupo de ratones inmunizados con el vector sin inserto FPgpt.

5 Tabla 3. Volumen tumoral y sobrevida en los ratones inmunizados con los fragmentos del gen del receptor del VEGF (KDR) .

Grupo	[ADN µg]	Vol. Tumoral (mm <sup>3</sup> ). Día 24	Supervivencia (Día 43)
pMAE5Δ5-KDR 1-3	100	424.0 ± 199.2 (***)	(***)
	50	756.32 ± 435.9 (***)	(**)
	10	1024.2 ± 397.1 (*)	(ns)
	1	1334.2 ± 620.7 (ns)	(ns)
pMAE5Δ5-KDR C	100	404.23 ± 200.0 (***)	(***)
	50	633.2 ± 365.2 (***)	(***)
	10	924.3 ± 437.1 (**)	(*)
	1	1114.2 ± 665.7 (*)	(ns)
FPKDRgpt	2.5*10 <sup>7</sup> ufp	304.23 ± 152.0 (***)	(***)
FPgpt	2.5*10 <sup>7</sup> ufp	1891.0 ± 726.0 (ns)	(ns)
PBS pH 7.2	-	1785.0 ± 826.0	-

10 Nota El volumen tumoral se reporta como la media ± SD de las mediciones realizadas a los animales de cada grupo, las comparaciones se realizaron utilizando un ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni. En el caso de la sobrevida se reporta la significación estadística encontrada al comparar por el método de Log-Rank cada grupo respecto al grupo control en el día indicado. La significación estadística se señala como: ns, p ≤ 0.05 no significativa; \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01; y \*\*\*, p ≤ 0.001.

#### Ejemplo 4

#### 15 Experimentos de protección *in vivo* empleando la vacunación con los plasmidios que contiene las isoformas del VEGF y su variante mutada

Grupos de 10 ratones C57BL/6 fueron vacunados o no, con las siguientes variantes:

1. pAECΔ2-VEGF<sub>121</sub> (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
2. pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
3. pMAE5Δ5-VEGF<sub>165</sub> (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
- 20 4. pMAE5Δ5-VEGF<sub>189</sub> (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
5. pMAE5Δ5 VEGF<sub>KDR(-)</sub> (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
6. PBS pH 7.2 (control negativo)

En todos los casos, la inmunización fue por vía intramuscular (im) en la pata trasera izquierda con un volumen de 50 µL totales. Todos los animales fueron

reinmunizados a los 15 días empleando el mismo régimen de la inmunización original. El reto tumoral se desarrolló 30 días después de la última inmunización con la inoculación subcutánea de  $10^4$  células del melanoma B16 F10 (ATCC CRL-6475) en la zona ventral derecha de todos los animales. Se realizó el monitoreo del crecimiento tumoral con tres mediciones semanales hasta que comenzaron a morir los ratones.

Para la variante de ADN desnudo en el vector de la serie pAEC en el grupo inmunizado con 100  $\mu$ g de ADN por animal, se observó un crecimiento tumoral menor que el del control negativo (Tabla 4). En las variantes incluidas en el vector de la serie pMAE5 $\Delta$ 5 con 5 sitios CpG, independientemente de la isoforma empleada, el tamaño tumoral fue significativamente menor con respecto al control negativo en los grupos de ratones inmunizados con las dosis de 10, 50 ó 100  $\mu$ g de ADN. En el caso que fue empleada la variante mutada pMAE5 $\Delta$ 5 VEGF<sub>KDR(-)</sub> se obtuvo una reducción significativa del tumor a dosis similares a las empleadas con el pMAE5 $\Delta$ 5-VEGF<sub>121</sub>.

Un análisis de sobrevida en el día 43 evidenció un aumento significativo (con respecto al control negativo) de este parámetro para los ratones inmunizados con las variantes pMAE5 $\Delta$ 5-VEGF<sub>121</sub>, pMAE5 $\Delta$ 5-VEGF<sub>165</sub>, pMAE5 $\Delta$ 5-VEGF<sub>189</sub>, pMAE5 $\Delta$ 5 VEGF<sub>KDR(-)</sub>, a dosis de 50 y 100  $\mu$ g de ADN por animal (Tabla 4).

Tabla 4. Volumen Tumoral y sobrevida en los ratones inmunizados con diferentes variantes de ADN desnudo conteniendo el gen del VEGF en diferentes isoformas y mutado.

Grupo	[ADN $\mu$ g]	Vol. Tumoral (mm <sup>3</sup> ) ( Día 24)	Supervivencia (Día 43)
PAEC $\Delta$ 2-VEGF <sub>121</sub>	100	991.5 $\pm$ 354 (*)	ns
	50	1429.2 $\pm$ 396 (ns)	ns
	10	1506.6 $\pm$ 442 (ns)	ns
	1	1660.5 $\pm$ 456 (ns)	ns
PMAE5 $\Delta$ 5-VEGF <sub>121</sub>	100	645.0 $\pm$ 215 (***)	***
	50	850.1 $\pm$ 463 (***)	***
	10	992.1 $\pm$ 410 (*)	ns
	1	1560.3 $\pm$ 598 (ns)	ns
PMAE5 $\Delta$ 5-VEGF <sub>165</sub>	100	799.2 $\pm$ 335 (***)	***
	50	916.6 $\pm$ 390 (**)	**
	10	1000.5 $\pm$ 662 (*)	ns

	1	1845.3 ± 450	(ns)	ns
PMAE5Δ5-VEGF <sub>189</sub>	100	790.1 ± 235	(***)	***
	50	996.5 ± 255	(*)	**
	10	1050.2 ± 362	(*)	ns
	1	1670.2 ± 408	(ns)	ns
pMAE5Δ5 VEGF <sub>KDR(-)</sub>	100	550.1 ± 335	(***)	***
	50	894.7 ± 408	(**)	***
	10	991.8 ± 362	(*)	ns
	1	1489.3 ± 510	(ns)	ns
PBS pH 7.2	0	1673.9 ± 712		

Nota El volumen tumoral se reporta como la media ± SD de las mediciones realizadas a los animales de cada grupo, las comparaciones se realizaron utilizando un ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni. En el caso de la sobrevida se reporta la significación estadística encontrada al comparar por el método de Log-Rank cada grupo respecto al grupo control en el día indicado. La significación estadística se señala como: ns, p ≤ 0.05 no significativa; \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01; y \*\*\*, p ≤ 0.001.

### Ejemplo 5

**Experimentos de protección *in vivo* en modelo de artritis inducida por colágeno mediante la inmunización con pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> y pMAE5Δ5-KDR 1-3**

Grupos de 20 ratones fueron vacunados o no con las siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> (50 µg de ADN/ratón) en PBS pH 7.2
2. pMAE5Δ5-KDR 1-3 (50 µg de ADN/ratón) en PBS pH 7.2
3. PBS pH 7.2 (Control negativo)

En todos los casos, la inmunización (día 0) fue por vía intramuscular (im) en la pata trasera izquierda con un volumen de 50 µL totales. Todos los animales fueron reinmunizados en el día 15 empleando el mismo régimen de la inmunización original. En el día 5 se inició la inducción de artritis autoinmune por inmunización con colágeno II de pollo (Sigma), modelo previamente descrito por Campbell IK y col (Campbell IK et al Eur. J. Immunol. 30: 1568, 2000). Esta inmunización se repitió en el día 26. Las cuatro patas de los ratones fueron evaluadas diariamente según el índice de artritis que establece una puntuación de 0 a 3 para cada pata por la presencia en el examen de signos de eritema (1), inflamación (2) o rigidez articular (3) con un valor máximo de 12. Los ratones comenzaron a manifestar los síntomas clínicos del desarrollo de la artritis a los 23 días de la inducción de la misma, alcanzándose el máximo de incidencia a los 50 días. En la tabla 5 aparece el análisis

de la incidencia de artritis en los animales de los diferentes grupos experimentales. En los días 40 y 55 se observa una reducción significativa de la incidencia de artritis en los grupos vacunados (1 y 2) en comparación con el grupo control.

5 Tabla 5. Incidencia de artritis en dos días seleccionados (40 y 55).

Grupo	Incidencia Día 40	Incidencia Día 55
1	20/8 (40%)	20/9 (45%)
2	20/6 (30%)	20/12 (60%)
3	20/10 (50%)	20/14 (70%)

### Ejemplo 6

#### Efecto antiangiogénico de la vacunación *in vivo*

Grupos de 15 ratones fueron vacunados o no con las siguientes variantes:

- 10 1. pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> (50 μg de ADN/ratón) en PBS pH 7.2
2. pMAE5Δ5-KDR 1-3 (50 μg de ADN/ratón) en PBS pH 7.2
3. pMAE5 KDR C (50 μg/ratón) en PBS pH 7.2
4. PBS pH 7.2 (Control negativo)

- 15 En todos los casos se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía intramuscular (im) en la pata trasera izquierda con un volumen de 50 μL totales. Todos los animales fueron reinmunizados a los 15 días empleando el mismo régimen de la inmunización original. Treinta días después de la última inmunización se evaluó la angiogénesis *in vivo* en estos animales usando matrigel como ya se ha descrito por Coughlin MC y col. (Coughlin MC et al. J. Clin. Invest. 101:1441, 1998). Los animales previamente
- 20 vacunados fueron divididos en grupos de 5 e inyectados por vía subcutánea en la línea media abdominal con 500μl de Matrigel (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA) conteniendo:

1. VEGF 50 ng/mL, Heparin 50 U/mL
2. 10<sup>5</sup> células de melanoma B16F10
- 25 3. PBS

A los seis días los animales fueron sacrificados y se extrajo el tapón de Matrigel, donde se analizó el contenido de hemoglobina de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Drabkin's reagent kit; Sigma Diagnostics Co., St. Louis, Missouri, USA).

- 30 La vacunación con los plasmidios que codifican para el VEGF o su receptor KDR inhibe de manera significativa ( $p < 0.001$ ) tanto la vascularización inducida por VEGF como la inducida por sistemas más complejos: células tumorales.

**Ejemplo 7.****Obtención de un inmunógeno basado en la unión no covalente de pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> a diferentes agentes adyuvantes.**

Se emplearon diferentes agentes inmunoestimuladores, previamente reportados, los que fueron mezclados con la construcción pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> con la metodología que se describe a continuación.

La proteína Opc de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* fue purificada acorde a lo reportado por Musacchio y cols (Musacchio A et al. Vaccine, 67:751, 1997). 50 μg/mL de pMAE5Δ5-VEGF<sub>120</sub> se añadieron a 10 μg/mL de Opc mediante agitación suave a pH ácido. El complejo resultante se dializó durante toda la noche en PBS pH 7.2 calidad endo free (Sigma). El grado de asociación entre el ADN plasmídico y la proteína Opc (Opc- pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub>) se chequeó mediante la visualización del ADN empleando un gel de agarosa al 1%. Más de un 50% del ADN plasmídico se asoció con la proteína Opc.

Las partículas super pequeñas (VSSP) provenientes del complejo de proteínas de la membrana externa (OMPC) de *Neisseria meningitidis* suministradas por el Centro de Inmunología Molecular (R. Perez et al United States Patent application 5788985, y 6149921) se emplearon para su combinación con el ADN plasmídico de interés. Las VSSP (1 mg) se incubaron con 5 mg de pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> durante toda la noche con agitación lenta. El material resultante se dializó extensivamente en PBS pH 7.2 calidad endo free (Sigma). El grado de asociación entre el ADN plasmídico y las VSSP (VSSP- pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub>) se chequeó mediante la visualización del ADN empleando un gel de agarosa al 1%. Más de un 50% del ADN plasmídico se asoció con las partículas de VSSP.

El antígeno particulado del core del virus de la Hepatitis C (HCcAg) y del virus de la Hepatitis B (HBcAg) se produjeron acorde con lo reportado previamente (Lorenzo LJ et al., Biochem Biophys Res Commun 281:962, 2001). 1 mg del antígeno se mezcló con 5 mg del plasmidio en una incubación durante toda la noche. El grado de asociación entre el ADN y el HCcAg o HBcAg (HCcAg- pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> y HBcAg- pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub>, respectivamente) se chequearon empleando el método convencional de la visualización de ADN en un gel de agarosa al 1%. Más del 50% del ADN se asoció con la partícula antigénica, en cada caso.

**Ejemplo 8**

**Experimentos de protección *in vivo* con la construcción pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> empleando adyuvantes de la respuesta inmune.**

Grupos de 10 ratones C57BL/6 fueron vacunados o no con las siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> (1, 10 y 50 μg de ADN/ratón) en PBS pH 7.2
2. Opc-pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> (1, 10 y 50 μg de ADN/ratón)
3. VSSP-pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> (1, 10 y 50 μg de ADN/ratón)
- 5 4. HBcAg-pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> (1, 10 y 50 μg de ADN/ratón)
5. HCcAg-pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> (1, 10 y 50 μg de ADN/ratón)
6. PBS pH 7.2 (Control negativo del grupo 1)
7. Opc (Control negativo del grupo 2)
8. VSSP (Control negativo del grupo 3)
- 10 9. HBcAg (Control negativo del grupo 4)
10. HCcAg (Control negativo del grupo 4)

El procedimiento de inmunización, reto con el tumor y medición del volumen tumoral fueron similares a los descritos en el ejemplo anterior. Las variantes vacunales con dosis similares o mayores de 10 μg de ADN/ ratón disminuyeron el crecimiento tumoral en comparación con sus respectivos controles negativos (Tabla 6). Una supervivencia significativamente superior al grupo control respectivo fue observada para los animales inmunizados con el gen del VEGF solo o asociado con OpC, VSSP, HCcAg y HBcAg como vehículos inmunopotenciadores. Todas las variantes con "vehículos" mostraron una sobrevida significativamente superior al control negativo respectivo desde dosis de 10 μg de ADN / ratón, mientras que la variante "desnuda" con el vector pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> resultó significativamente diferente del control negativo con la dosis de 50 μg de ADN/ratón (Tabla 6).

Tabla 6 Volumen tumoral y sobrevida en los ratones inmunizados empleando diferentes agentes inmunoestimuladores.

Grupo	[ADN μg]	Vol. Tumoral (cm <sup>3</sup> ). (Día 24)	Supervivencia (Día 43)
pMAE5Δ5-VEGF	50	1050.9 ± 689 (**)	ns
	10	1229.0 ± 596 (*)	ns
	1	1895.3 ± 596 (ns)	ns
OpC-pMAE5Δ5-VEGF	50	960.6 ± 456 (**)	**
	10	1100.5 ± 615 (**)	*
	1	1654.8 ± 663 (ns)	ns
VSSP-pMAE5Δ5-VEGF	50	884.6 ± 410 (***)	**
	10	1002.3 ± 598 (**)	*

	1	1532.7 ± 745	(ns)	ns
HBcAg-pMAE5Δ5-VEGF	50	950.1 ± 570	(**)	**
	10	1230.5 ± 662	(*)	*
	1	1867.2 ± 652	(ns)	ns
HCCAg-pMAE5Δ5-VEGF	50	950.1 ± 570	(**)	**
	10	1230.5 ± 662	(*)	*
	1	1867.2 ± 652	(ns)	ns
OpC (5µg/ratón/dosis)	5 µg	2059.0 ± 687	(ns)	ns
VSSP		2156.0 ± 759	(ns)	ns
HBcAg (5µg/ratón/dosis)		1998.2 ± 798	(ns)	ns
HCCAg (5µg/ratón/dosis)		1897.0 ± 812	(ns)	ns
PBS pH 7.2		2073.0 ± 816	(ns)	ns

Nota: El volumen tumoral se reporta como la media ± SD de las mediciones realizadas a los animales de cada grupo, las comparaciones se realizaron utilizando un ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni. En el caso de la sobrevida se reporta la significación estadística encontrada al comparar por el método de Log-Rank cada grupo respecto al grupo control en el día indicado. La significación estadística se señala como: ns, p ≤ 0.05 no significativa; \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01; y \*\*\*, p ≤ 0.001.

### Ejemplo 9

#### Experimentos de protección in vivo empleando la vacunación con el VEGF en su forma proteica.

Grupos de 10 ratones C57BL/6 fueron vacunados o no, con las siguientes variantes: VEGF<sub>165</sub> (20 µg /ratón) con Adyuvante completo e incompleto de Freund  
Adyuvante completo e incompleto de Freund (control negativo)

El antígeno de VEGF<sub>165</sub> se obtuvo de una fuente comercial (Sigma) con más de un 97% de pureza. Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal empleando el adyuvante completo de Freund (Sigma) con re-inmunizaciones en el día 15 y 30 por la misma vía, pero empleando el adyuvante incompleto de Freund. El reto tumoral y medición del volumen tumoral fueron similares a los descritos en el ejemplo anterior. Se observó una disminución significativa del volumen tumoral y aumento de la sobrevida al reto tumoral, con respecto al grupo control no inmunizado, similar a la descrita en los ejemplos anteriores para las inmunizaciones con ADN VEGF.

### Ejemplo 10

**Experimentos *in vivo* de transferencia de la protección inmune en ratones C57BL/6 con una inmunodeficiencia severa combinada (SCID).**

Ratones C57BL/6 fueron inmunizados o no con dosis de pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> a 50 μg de ADN/ratón mediante los procedimientos descritos en el ejemplo 5. Los ratones se sacrificaron al día 45 de la inmunización inicial, y los linfocitos CD8, CD4 y tipo B de los ratones inmunizados o no, se separaron empleando perlas magnéticas (Dynabeads, USA), acorde a lo recomendando por los fabricantes.

Grupos de 10 ratones C57BL/6 SCID con 6 semanas de edad fueron "reconstituidos" con las siguientes combinaciones de los linfocitos extraídos anteriormente.

Grupo 1: Linfocitos T CD8+, y linfocitos T CD4+ provenientes de ratones inmunizados con el pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub>. No se reconstituyen linfocitos B.

Grupo 2: Linfocitos B y T CD4+ de ratones inmunizados, y linfocitos T CD8+ de ratones no inmunizados

Grupo 3: Linfocitos B, linfocitos T CD8+, y linfocitos T CD4+ de ratones inmunizados, como control positivo del experimento

Grupo 4: Linfocitos B y linfocitos T CD8+, y linfocitos T CD4+ de ratones no inmunizados, como control negativo del experimento

Los ratones SCID "reconstituidos" fueron retados con 10<sup>4</sup> células del melanoma B16 F10 por vía subcutánea. Se realizó el monitoreo del crecimiento tumoral con tres mediciones semanales hasta que comenzaron a morir los ratones. El nivel de anticuerpos anti-VEGF se monitoreó mediante un ELISA de laboratorio. Placas de 96 pocillos se recubrieron con VEGF165 (Sigma) a 0.5 μg/mL. Las placas se bloquearon con PBS-BSA 1% (BDH, UK), y posteriormente se incubaron con diluciones seriadas del suero de los ratones. Luego de lavar los pocillos con PBS-Tween 0,05% se procedió a incubar los mismos con un policlonal comercial anti IgG de ratón (Sigma, A0168). La señal se amplificó en presencia del sustrato comercial orto-fenilen-diamina (OPD, Sigma).

En la tabla 7 se reflejan los resultados de volumen tumoral (día 24) y sobrevida (día 40) de los grupos de ratones sometidos al reto tumoral. A partir del día 15 post-reconstitución los animales del grupo 1 al 3 presentaron una reducción del tamaño tumoral con respecto al grupo 4, reconstituido con linfocitos de ratones no inmunizados. Por lo tanto, el efecto que desencadena el sistema inmunológico en los ratones inmunizados, que posibilita la disminución del tamaño tumoral está relacionado con una respuesta humoral (linfocitos B) y celular (linfocitos T), está última de tipo citotóxica (CTL) producto de la ausencia de anticuerpos anti-VEGF en el suero de los ratones del grupo 1. Sin embargo, en las condiciones experimentales



- empleadas la sobrevida sólo fue superior en el grupo 3 (linfocitos B y T de ratones inmunizados) con respecto al resto de los grupos ensayados (Tabla 7). En los animales reconstituidos parcialmente donde se encontraba ausente la respuesta B o T de tipo CTL, grupos 1 y 2, respectivamente, la sobrevida no difirió del control negativo, lo que demuestra que la respuesta humoral y celular (combinada), grupo 4, posee un efecto sinérgico que posibilita la respuesta efectiva capaz de alargar la vida de los ratones sometidos al reto tumoral.

Tabla 7. Volumen tumoral y sobrevida en los ratones SCID reconstituidos con linfocitos de ratones inmunizados con pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub>.

Grupo	Ratones donantes de linfocitos a los C57BL/6 SCID			Vol Tumoral (Día 24)	Supervivencia (Día 40)
	Linf. B	Linf. CD4+	Linf. CD8+		
1	-	Inmunizados	Inmunizados	1067.8 ± 689 (ns)	ns
2	Inmunizados	Inmunizados	No inmunizados	1129.0 ± 596 (ns)	ns
3	Inmunizados	Inmunizados	Inmunizados	652.3 ± 396 (***)	***
4	No inmunizados	No inmunizados	No inmunizados	1856.0 ± 756	-

- Nota: Los ratones donantes fueron inmunizados o no con el pMAE5Δ5-VEGF a 50 µg de ADN /ratón; Nota: El volumen tumoral se reporta como la media ± SD de las mediciones realizadas a los animales de cada grupo, las comparaciones se realizaron utilizando un ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni. En el caso de la sobrevida se reporta la significación estadística encontrada al comparar por el método de Log-Rank cada grupo respecto al grupo control en el día indicado. La significación estadística se señala como: ns, p ≤ 0.05 no significativa; \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01; y \*\*\*, p ≤ 0.001.

### Ejemplo 11

- Demostración de la restauración inmunológica por depleción del VEGF circulante a través de la respuesta inmune**

Grupos de 15 ratones C57BL/6 hembra fueron inyectados por vía im., con las siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-VEGF<sub>121</sub> (50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
2. PBS pH 7.2

En todos los casos, la inmunización fue por vía im. en la pata trasera izquierda con un volumen total de 50 µL. Todos los animales fueron re-inmunizados a los 15 días

empleando el mismo régimen de la inmunización original. Treinta días después de la última inmunización, 5 animales por grupo seleccionados de forma aleatoria, se sacrificaron para analizar el estado inmunológico de los animales inmunizados y sus controles, así como la toxicidad de la vacunación sobre órganos y tejidos, mediante evaluaciones macroscópicas e histológicas.

A los animales restantes de cada grupo se les inyectó por vía sc.  $10^4$  células del melanoma B16 F10 (ATCC CRL-6475) en la zona ventral derecha. A los 15 y 30 días después de la inyección de las células tumorales, se sacrificaron 5 ratones por grupo que fueron evaluados de manera similar a la descrita previamente.

En ningún animal evaluado se evidenció la ocurrencia de eventos tóxicos a un nivel macroscópico y el análisis histopatológico no reveló la presencia de daños en ninguno de los órganos analizados a los 30 días de la última inmunización. La evaluación inmunológica consistió en: (1) contenido en suero de VEGF murino; (2) contenido celular de linfocitos B y T, así como, el grado de maduración de células dendríticas en el bazo y en los nódulos linfáticos braquiales, axilares e inguinales.

El análisis de los niveles de VEGF (R&D kit para VEGF murino) en el suero de los animales no tratados indica que, al aumentar el tiempo de exposición al tumor los niveles de VEGF se incrementan en el suero en concordancia además con el incremento de la talla tumoral a lo largo del tiempo. En el grupo inmunizado contra VEGF humano se observa una reducción significativa ( $p < 0.001$  ANOVA, post-test Bonferroni) en los niveles de VEGF que se prolonga aún a los 30 días después del reto tumoral.

El estado del sistema inmunológico de los animales sacrificados en cada momento fue analizado a través del estudio de las proporciones de las poblaciones celulares presentes en los nódulos linfáticos y el bazo según lo reportado por Gabrilovich y colaboradores (Gabrilovich D et al. Blood 92:4150, 1998). Para estos estudios se emplearon anticuerpos monoclonales comerciales contra CD3, CD19, CD11c y CD86 (B7-2) (Pharmingen) marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE) que permitieron la visualización de las poblaciones celulares usando un citómetro de flujo (FACS). Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los resultados del análisis por FACS de las poblaciones celulares de interés según sus marcadores de superficie.

	Células totales	Fracción enriquecida con células dendríticas

Grupo (día)	Nódulos Linfáticos		Bazo		Nódulos Linfáticos	Bazo
<b>A: No inmunizado</b>	CD-19	CD-3	CD-19	CD-3	CD-11c/B7-2	CD-11c/B7-2
No inmunizados (30 días)	8%	86%	38.1%	40.8%	60%	62.4%
Post reto tumoral (60 días)	20.1%	60.5%	3.8	11.4%	32.8%	10.2%
<b>B: Inmunizados</b>	CD-19	CD-3	CD-19	CD-3	CD-11c/B7-2	CD-11c/B7-2
Inmunizados (30 días)	7.2%	87.3%	40%	39%	58.6%	60.3%
Post reto tumoral (60 días)	10.9%	80.1%	25.4	34%	53.5%	52.9%

Nota: En todos los casos los valores indican los % de células positivas del total cuantificada

- Los análisis de las poblaciones celulares linfoides y de la maduración de células dendríticas en los animales 30 días después de la última inmunización, indican que la vacunación con ADN VEGF no induce ningún cambio en el "estado inmune" del animal. Sin embargo, 30 días después de haber implantado los tumores, los animales no vacunados muestran una disminución en la relación linfocitos T/linfocitos B (CD3/CD19) tanto en nódulos linfáticos como en bazo, respecto a la relación observada antes del reto tumoral. Además, en particular en el bazo se reduce ostensiblemente el número de células linfoides. También se observó que en estos animales se produce una reducción del número de células dendríticas maduras tanto en nódulos linfáticos como en bazo. En el grupo de ratones vacunados con ADN VEGF se evidencia una recuperación significativa en todos los órdenes que pudiera correlacionarse con la disminución de los niveles de VEGF en suero observados en los animales de este grupo.

**REIVINDICACIONES****INMUNOTERAPIA ACTIVA ANTIANGIOGÉNICA.**

- 5           1. Método para la vacunación activa caracterizado por la administración  
adyuvada o no de una composición vacunal compuesta por polipéptidos y/u  
oligonucleótidos codificantes para proteínas asociadas directamente a un  
incremento de la angiogénesis, y sus variantes
- 10           2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque las proteínas  
asociadas directamente a un incremento de la angiogénesis pertenecen a la  
familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)
3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es  
una de las isoformas del VEGFA
- 15           4. Método según las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado porque la proteína  
es el VEGFA 121
5. Método según las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado porque la proteína  
es el VEGFA 165
6. Método según las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado porque la proteína  
es el VEGFA 189
- 20           7. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es  
una de las isoformas del VEGFB
8. Método según las reivindicaciones 1, 2 y 7, caracterizado porque la proteína  
es el VEGFB 167
9. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es  
25           el VEGFC
10. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es  
el VEGFD
11. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es  
el PIGF
- 30           12. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque las proteínas  
asociadas directamente a un incremento de la angiogénesis pertenecen al  
grupo de receptores y co-receptores del VEGF
13. Método según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado porque la proteína  
es el VEGFR1
- 35           14. Método según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado porque la proteína  
es el VEGFR2

15. Método según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado porque la proteína es el VEGFR3
16. Método según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado porque la proteína es el NRP1
- 5 17. Método según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado porque la proteína es el NRP2
18. Método según las reivindicaciones 1 a la 17, caracterizado por contener como inmunógenos mutantes derivados de la familia del VEGF humano o sus receptores
- 10 19. Método según las reivindicaciones 1 a la 18, caracterizado porque los antígenos administrados son de naturaleza autóloga
20. Método según las reivindicaciones 1 a la 18, caracterizado porque los antígenos administrados son de naturaleza heteróloga
21. Método según las reivindicaciones 1 a la 20, caracterizado porque los  
15 inmunógenos son sintéticos, recombinantes, quiméricos o naturales.
22. Método según las reivindicaciones 1 a la 21, caracterizado porque los inmunógenos son de naturaleza peptídica.
23. Método según la reivindicación 1 caracterizado por comprender como  
20 inmunógenos la mezcla de al menos dos de las moléculas contenidas en las reivindicaciones de la 2 a la 22
24. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de tumores en mamíferos
25. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento y prevención de tumores en humanos.
- 25 26. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como en procesos neoplásicos malignos y sus metástasis en humanos.
27. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como en procesos  
30 neoplásicos benignos.
28. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como en procesos inflamatorios agudos y crónicos.
29. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de  
35 entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como en procesos autoinmunes.

30. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como en alteraciones oculares.
- 5 31. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 24 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, en específico, de animales afectivos y ganado.
- 10 32. Una composición vacunal caracterizada por contener polipéptidos y/u oligonucleótidos codificantes y sus variantes, para proteínas asociadas directamente a un incremento de la angiogénesis, administradas en presencia o no de adyuvante farmacéuticamente aceptable
33. Una composición vacunal según la reivindicación 32, caracterizada porque la proteína asociada es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)
34. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 33, caracterizada porque la proteína asociada es una de las isoformas del VEGFA
- 15 35. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32, 33 y 34, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFA 121
36. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32, 33 y 34, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFA 165
- 20 37. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32, 33 y 34, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFA 189
38. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 33, caracterizada porque la proteína asociada es una de las isoformas del VEGFB
39. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32, 33 y 38, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFB 167
- 25 40. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 33, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFC
41. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 33, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFD
- 30 42. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 33, caracterizada porque la proteína asociada es el PIGF
43. Una composición vacunal según la reivindicación 32, caracterizada porque la proteína asociada pertenece al grupo de receptores y co-receptores del VEGF
- 35 44. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 43, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFR1
45. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 43, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFR2

46. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 43, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFR3
47. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 43, caracterizada porque la proteína asociada es el NRP1
- 5 48. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 43, caracterizada porque la proteína asociada es el NRP2
49. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 48, caracterizada por contener como inmunógenos, mutantes derivados de la familia del VEGF humano, sus receptores o coreceptores
- 10 50. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 49, caracterizada porque los antígenos son de naturaleza autóloga
51. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 49, caracterizada porque los antígenos son de naturaleza heteróloga
- 15 52. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 51, caracterizada porque los inmunógenos son sintéticos, recombinantes, quiméricos o naturales.
53. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 51, caracterizada porque los inmunógenos son de naturaleza peptídica.
- 20 54. Una composición vacunal según la reivindicación 32 caracterizado por comprender como inmunógenos la mezcla de al menos dos de las moléculas contenidas en las reivindicaciones de la 33 a la 53
55. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 54 donde el inmunógeno es administrado como parte de vectores plásmidicos
- 25 56. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 54 donde el inmunógeno es administrado como parte de vectores virales
57. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 54 donde el inmunógeno es administrado en forma polipeptídica
- 30 58. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 57 donde el inmunógeno es administrado asociado covalentemente o no a un adyuvante
59. Una composición vacunal según la reivindicación 58 donde el adyuvante es particulado
- 35 60. Una composición vacunal según la reivindicación 59 donde el adyuvante es específicamente la partícula recombinante del antígeno del core del virus de las Hepatitis B

61. Una composición vacunal según la reivindicación 59 donde el adyuvante es específicamente la partícula recombinante del antígeno del core del virus de las Hepatitis C.
- 5 62. Una composición vacunal según la reivindicación 59 donde el adyuvante es específicamente la VSSP
63. Una composición vacunal según la reivindicación 58 donde el adyuvante es de naturaleza proteica.
64. Una composición vacunal según la reivindicación 63 donde el adyuvante es la proteína Opc
- 10 65. Una composición vacunal según la reivindicación 63 donde el adyuvante es la proteína KLH
66. Una composición vacunal según la reivindicación 58 donde el adyuvante es una emulsión
- 15 67. Una composición vacunal según la reivindicación 66 donde el adyuvante es el adyuvante de Freund o sus derivados
68. Una composición vacunal según la reivindicación 66 donde el adyuvante es el Montanide ISA 51



## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética Y Biotecnología

5 <120> Inmunoterapia activa antiangiogénica

<130> Listado de secuencias

<140> CU 2002/0076

10 <141> 2002-04-15

<150> EP98001000

<151> 1998-01-31

15 <160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

<400> 1

tggatccatg aactttctgc t

21

30 <210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

&lt;400&gt; 2

gaattcaccg cctcggcttg tc

22

&lt;210&gt; 3

5 &lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

&lt;400&gt; 3

tggatccatg aactttctgc t

21

15 &lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

20 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

&lt;400&gt; 4

ctggccttgt gcaggtgcga ttgccataat

30

25

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

30

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

&lt;400&gt; 5

35 attatggcaa tcgcacctgc acaaggccag

30

&lt;210&gt; 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

<400> 6

gaattcaccg cctcggcttg tc 22

10

<210> 7

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

<400> 7

20 tggatccatg aactttctgc t 21

<210> 8

<211> 22

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

30 <400> 8

gaattcaccg cctcggcttg tc 22

<210> 9

<211> 25

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

&lt;400&gt; 12

tgagatcttc gggagcttc

20

&lt;210&gt; 13

5 &lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

&lt;400&gt; 13

gaagatctgt ataaggactt c

21

&lt;210&gt; 14

15 &lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

20 &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

&lt;400&gt; 14

tagcggccgc ttaaacagg

19

25

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

30

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

&lt;400&gt; 15

35 aggcctctac acctgccagg ca

22

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

<400> 16

10 cctagggttaa acaggaggag

20

<210> 17

<211> 21

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

20

<400> 17

cccgggatat ttataaagat c

21

25 <210> 18

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo

<400> 18

tagcggccgc ttaaacagg

19

35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/00 03/00004

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/18 A61K38/17 A61K48/00 C07K14/475 C07K14/71  
 C12N15/12 A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K C12N A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 53219 A (MADSEN JOHN ; ENTREMED INC (US); HOLADAY JOHN W (US); RUIZ ANTONIO) 14 September 2000 (2000-09-14) the whole document	1-19, 23, 32-50, 54
Y	---	20-22, 24-31, 51-53, 55-68
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 2003

Date of mailing of the international search report

11. 09. 2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Relaño Reyes , Eva

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/00 03/00004

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEI, Y-Q ET AL.: "Immunogene therapy of tumors with vaccine based on Xenopus homologous vascular endothelial growth factor as a model antigen." PNAS, vol. 98, no. 20, September 2001 (2001-09), XP002248645 page 11545 -page 11550	1-18, 32-48
Y		20-22, 24-31, 51-53, 55-68
A	--- DAVIDOFF, A.M. ET AL.: "Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice." CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 7, September 2001 (2001-09), XP002248646 page 2870 -page 2879	
A	--- PREWETT, M. ET AL.: "Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors." CANCER RESEARCH, vol. 59, October 1999 (1999-10), XP002248647 page 5209 -page 5218 -----	



**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-31  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  

Although claims 1 to 31 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CG 03/00004

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0053219	A	14-09-2000	AU 3397200 A 28-09-2000
		CA 2364503 A1 14-09-2000	
		EP 1156824 A2 28-11-2001	
		JP 2002538219 A 12-11-2002	
		WO 0053219 A2 14-09-2000	

---

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°  
PCT/03/00004

## A. CLASIFICACIÓN DE LA INVENCIÓN

CIP 7 A61K38/18 A61K38/17 A61K48/00 C07K14/475 C07K14/71  
C12N15/12 A61P43/00

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 7 A61K C07K C12N A61P

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	WO 00 53219 A (MADSEN JOHN ; ENTREMED INC (US); HOLADAY JOHN W (US); RUIZ ANTONIO) 14 Septiembre 2000 (2000-09-14) el documento completo	1-19,23, 32-50,54
Y	---	20-22, 24-31, 51-53, 55-68
	-/--	



En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales



Véase el Anexo de la familia de patentes.

\* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

21. Julio 2003

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

11. 09. 2003

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Relaño Reyes , Eva

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°  
PCT/03/00004

## C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría°	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	WEI, Y-Q ET AL.: "Immunogene therapy of tumors with vaccine based on Xenopus homologous vascular endothelial growth factor as a model antigen." PNAS, vol. 98, num. 20, Septiembre 2001 (2001-09), XP002248645 página 11545 -página 11550	1-18, 32-48
Y		20-22, 24-31, 51-53, 55-68
A	DAVIDOFF, A.M. ET AL.: "Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice." CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 7, Septiembre 2001 (2001-09), XP002248646 página 2870 -página 2879	
A	PREWETT, M. ET AL.: "Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors." CANCER RESEARCH, vol. 59, Octubre 1999 (1999-10), XP002248647 página 5209 -página 5218	

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°  
PCT/CN/03/00004

Documento de patente citado en el Informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0053219 A	14-09-2000	AU 3397200 A	28-09-2000
		CA 2364503 A1	14-09-2000
		EP 1156824 A2	28-11-2001
		JP 2002538219 A	12-11-2002
		WO 0053219 A2	14-09-2000
-----			